

**Leistungsfähigkeiten und Grenzen von Phytotoxizitätstests  
unter besonderer Berücksichtigung von  
Untertagedeponie-relevanten Abfalleluaten**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von Mathias Wundram  
aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. D. Selmar

2. Referent: Prof. Dr. Mult. Dr. h.c. A.M. Bahadir

eingereicht am: 09.09.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.11.1999

**Für Anja**

## **Vorveröffentlichungen**

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Dirk Selmar, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

Wundram, M., Selmar, D., Wilken, G., Larink, O., Müller, M., Bahadir, M (1996): Ökotoxikologische Bewertung von Deponiesickerwässern und Abfall-Eluaten. Entsorgungspraxis 14 (7/8): 62-66

Wundram, M., Selmar, D., Bahadir, M. (1997): Representative evaluation of phytotoxicity - reliability and peculiarities, Journal of Applied Botany 71: 139-143

Brasser, Th, Bahadir, M., Schramm, K.W. (1998): Erprobung und Anpassung ökotoxikologischer Methoden zur Bewertung UTD-relevanter Abfall-Eluate - Abschlußbericht - Gesellschaft für Anlagen- und Reaktorsicherheit, GRS - A - 2592

Wundram, M., Bahadir, M. (1999): Ecotoxicological test systems for prediction of environmental behaviour of toxic compounds in underground disposals. Fresenius Environmental Bulletin 8: 280-287

Bahadir, M., Wundram, M. (1998): Ecotoxicological Test Systems for the Evaluation of Toxic Compounds in Effluents. In: 1<sup>st</sup> International Workshop on "Environmental Quality And Environmental Engineering in The Middle East Region" Bahadir & Burdurlu (eds), S.U. Env. Eng. Dept., Konya, Turkey: 160-171

Wundram, M., Schrader, G., Bahadir, M. (1998): Ökotoxikologische Bewertung von Rückständen aus der Abfallverbrennung. In: Stoffstromspezifische Abfallbehandlung im Hinblick auf thermische Verfahren, Veröffentlichung des Zentrums für Abfallforschung (ZAF) der TU Braunschweig, Heft 13: 263-278

### **Tagungsbeiträge:**

Wundram, M., Schrader, G., Müller, M., Bahadir, M. (1997): Analytik und ökotoxikologisches Verhalten von Rückständen aus Abfallverbrennungsanlagen. Posterbeitrag auf der Jagrestagung der GDCh, Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, 03.-04.11.1997, Heidelberg

Bahadir, M., Wundram, M. (1998): Ecotoxicological Test Systems for the Evaluation of Toxic Compounds in Effluents. Vortrag auf dem 1<sup>st</sup> International Workshop on Environmental Quality And Environmental Engineering in The Middle East Region, 05.-07.10.1998, Konya, Türkei

Wundram, M., Schrader, G., Bahadir, M. (1998): Ökotoxikologische Bewertung von Rückständen aus der Abfallverbrennung. Vortrag auf dem 13. ZAF-Seminar: Stoffstromspezifische Abfallbehandlung, 24.-25.09.1998, Braunschweig

## Danksagung

Herrn **Prof. Dr. D. Selmar** möchte ich an dieser Stelle danken, für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Botanischen Institut in Braunschweig und für viele Anregungen und Diskussionen, die halfen theoretische und praktische Probleme zu lösen.

Herrn **Prof. Dr. Dr. M. Bahadir**, aus dessen Arbeitsgebiet am Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik sich die Fragestellung zu dieser Arbeit entwickelt hat, danke ich für die intensive Unterstützung und große Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich besonders bei Frau **Dr. Gritta Schrader** für die angenehme Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis auch über die Laborwände hinaus.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Botanisches Institutes, Abteilung Pflanzenphysiologie, für die Schaffung eines wirklich freundschaftlichen Arbeitsklimas danken. Frau **Daniela Gröger**, Frau **Melanie Butz** und Frau **Dagmar Wrann** gilt mein Dank darüber hinaus für ihre große Hilfe bei der Durchführung der Fluoreszenzmessungen am Tabak. Ich danke Herrn **Dr. Pablo Serrano Minar** für die Hilfe bei der Überwindung der ersten methodischen Hürden der Fluoreszenzmessung und Frau **Dr. Heike Sarstedt** für ihre große Unterstützung und die Durchsicht des Manuskriptes.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Ökologische Chemie und Abfallanalytik für ihre Unterstützung, die mir zu einer sehr erfolgreichen und angenehmen Zeit verholfen hat. Herrn **Marc Müller** danke ich für die Durchführung der chemischen Elementanalysen.

Herrn **Prof. Dr. H. Lehmann**, Herrn **Dr. R. Stelzer** und Frau **Kunz** vom Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich für die Ermöglichung und intensive Mithilfe bei der Durchführung der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *Nicotiana tabacum*.

Herrn **Dr. Berlin** (GBF Braunschweig) gilt mein Dank für die Überlassung der Zellkulturen von *Nicotiana tabacum*.

Herrn **Dr. Th. Brasser** und seinen Mitarbeitern von der GRS Braunschweig danke ich für die Zurverfügungstellung der Salzlaugen und Abfalleluat.

Ich danke dem BMBF für die Finanzierung des Projektes, in dessen Rahmen ich diese Arbeit angefertigt habe.

Meinen **Eltern** und meiner **Schwiegermutter** danke ich für ihr Verständnis und die große Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau **Anja**, deren Geduld und Verständnis in einer oft nicht einfachen Zeit entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus unterstützte sie mich mit zahlreichen kritischen Diskussionen und der Durchsicht des Manuskriptes.

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Versuchspflanzen und -algen .....</b>	<b>7</b>
2.1.1 Algen.....	7
2.1.2 Wasserlinse ( <i>Lemna minor</i> ) .....	9
2.1.3 Gartenkresse ( <i>Lepidium sativum</i> ) .....	10
2.1.4 Pflanzen für den terrestrischen Pflanzenwachstumstest .....	11
2.1.5 Zellkultur von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	11
2.1.6 Tabakpflanzen ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) .....	13
<b>2.2 Untersuchte Abfälle .....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Art und Herkunft der Abfälle.....	13
2.2.2 Herstellung der Abfalleluate .....	14
2.2.2.1 Verwendete Elutionsmittel .....	14
2.2.2.2 Kaskadenelution .....	16
2.2.2.3 Mit Schwermetallen dotierte IP21-Lauge .....	18
2.2.2.4 Mit Schwermetallen dotiertes aqua dest. ....	19
2.2.2.5 Herstellung der Testlösungen mit Zusätzen von Rückständen aus gefriergetrocknetem Leitungswasser .....	20
<b>2.3 Phytotoxizitätstests .....</b>	<b>20</b>
2.3.1 Bestimmung der Photosyntheserate von <i>Chlamydomonas</i> .....	20
2.3.2 Fluoresceindiacetattest mit <i>Chlamydomonas</i> .....	21
2.3.3 Wachstumstests mit <i>Lemna</i> und <i>Lepidium</i> .....	22
2.3.3.1 <i>Lemna</i> -Blattwachstumstest.....	23
2.3.3.2 Wurzellängentest mit <i>Lepidium sativum</i> .....	23
2.3.4 Terrestrischer Pflanzenwachstumstest (Terrestrial Plants, Growth Test) .....	24
2.3.5 Zellkultur-Wachstumshemmtest.....	24
2.3.6 Chlorophyllfluoreszenz von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	25
<b>2.4 Chlorophyllbestimmung/Frischgewichtbestimmung.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 Chemische Elementanalysen.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Elektronenmikroskopie und EDX-Analysen.....</b>	<b>32</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswahl und Anpassung der Tests</b>	<b>34</b>
3.1.1	Auswahl	34
3.1.2	Anpassung und Optimierung einzelner Testverfahren	36
3.1.2.1	Anpassung und Optimierung des <i>Chlamydomonas</i> -FDA-Tests	36
3.1.2.2	Anpassung und Optimierung des Wachstumshemmtests mit einer Zellkultur von <i>Nicotiana tabacum</i>	42
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Tests mit Salzlaugen und Abfalleluaten</b>	<b>43</b>
3.2.1	<i>Chlamydomonas</i> -Photosynthesetest	44
3.2.1.1	Salzlaugeneluate	44
3.2.1.2	Eignung des <i>Chlamydomonas</i> -Photosynthesetests zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluate	46
3.2.1.3	Grundwassereluate	46
3.2.1.4	Vergleich der Salzlaugeneluate mit den Grundwassereluaten	48
3.2.2	<i>Chlamydomonas</i> -FDA-Test	48
3.2.2.1	Salzlaugeneluate	48
3.2.2.2	Eignung des <i>Chlamydomonas</i> -FDA-Tests zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluate	50
3.2.2.3	Grundwassereluate	50
3.2.2.4	Vergleich der Salzlaugeneluate mit den Grundwassereluaten	52
3.2.3	<i>Lemna</i> -Blattwachstumstest	52
3.2.3.1	Salzlaugeneluate	52
3.2.3.2	Eignung des <i>Lemna</i> -Blattwachstumstests zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluate	54
3.2.3.3	Grundwassereluate	54
3.2.3.4	Vergleich der Salzlaugeneluate mit den Grundwassereluaten	55
3.2.4	<i>Lepidium</i> -Wurzellängentest	55
3.2.4.1	Salzlaugeneluate	55
3.2.4.2	Eignung des <i>Lepidium</i> -Wurzellängentest zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluate	57
3.2.4.3	Grundwassereluate	57
3.2.4.4	Vergleich der Salzlaugeneluate mit den Grundwassereluaten	59

3.2.5	Vergleich der mit <i>Lemna</i> , <i>Lepidium</i> und <i>Chlamydomonas</i> erzielten Testergebnisse aller Eluate .....	59
3.2.5.1	Vergleich der Wirkungen der Grundwassereluate auf die verschiedenen Testorganismen .....	59
3.2.5.2	Vergleich der Wirkungen der Salzlaugeneluate auf die Testorganismen .....	61
3.2.6	Beeinflussung der Tests mit <i>Lemna</i> und <i>Lepidium</i> durch die Kulturbedingungen .....	62
3.2.7	Terrestrischer Pflanzenwachstumstest nach OECD .....	67
3.2.8	Zellkultur-Test .....	69
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen an <i>Nicotiana tabacum</i>.....</b>	<b>71</b>
3.3.1	Eignung des Chlorophyllfluoreszenztests mit <i>Nicotiana</i> zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten .....	71
3.3.1.1	Ergebnisse der Messung des Fv/Fm-Wertes.....	74
3.3.1.2	Effekte der Testlösungen auf den Streßparameter Rfd .....	75
3.3.1.3	Erfassung der Meßgröße A <sub>max</sub> .....	76
3.3.1.4	Die Bestimmung der Meßgröße "Yield".....	77
3.3.2	Konzentration von Schwermetallen und anderen Elementen in <i>Nicotiana</i> .....	80
3.3.2.1	Konzentration der zudosierten Schwermetalle .....	80
3.3.2.2	Gehalte der Pflanzen an den Elementen, die in der IP21-Lösung in hohen Konzentrationen vorkommen (Mg, Na, S, K).....	85
3.3.2.3	Konzentration von Elementen, die nicht, oder nur in geringen Mengen in der IP21-Lösung enthalten sind (Ca, B, Mn, Mo) .....	90
3.3.2.4	Schlußfolgerung.....	94
3.3.3	Wirkung von Salz- und Schwermetallstreß auf <i>Nicotiana</i> über eine gesamte Vegetationsperiode hinweg .....	95
3.3.3.1	Beeinflussung der Chlorophyllfluoreszenz der unterschiedlichen Blattetagen.....	97
3.3.3.2	Quantitative Unterschiede der Schädigungen der drei Testlösungen auf die Chlorophyllfluoreszenz von <i>Nicotiana</i> .....	111
3.3.3.3	Veränderung des Chlorophyllgehaltes der Blätter und Einfluß der Stressoren auf die Biomasseproduktion .....	114



3.3.3.4	Mikroskopische Untersuchungen und EDX-Analysen an <i>Nicotiana</i> .....	120
3.3.3.5	Einfluß von Nährstoffmangel auf die Chlorophyllfluoreszenz von <i>Nicotiana</i> .....	132
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>135</b>
<b>4.1</b>	<b>Ist mit <i>Chlamydomonas</i> eine Detektion der Schwermetalle möglich? .....</b>	<b>137</b>
<b>4.2</b>	<b>Überprüfung der Verlässlichkeit des <i>Chlamydomonas</i>- Photosynthesetests .....</b>	<b>140</b>
<b>4.3</b>	<b>Bewertung der Ergebnisse der Ökotoxizitätstests mit <i>Chlamydomonas</i>, <i>Lemna</i> und <i>Lepidium</i> .....</b>	<b>141</b>
<b>4.4</b>	<b>Untersuchungen mit <i>Nicotiana tabacum</i>.....</b>	<b>143</b>
4.4.1	Direkte Schädigungen des Photosyntheseapparates .....	144
4.4.1.1	Schwermetallkonzentrationen im Gewebe.....	144
4.4.1.2	Auswirkungen von Salzstreß.....	146
4.4.2	Sekundäre Schädigungen des Photosyntheseapparates .....	147
4.4.2.1	Zerstörung der Wurzeln .....	147
4.4.2.2	Chlorophyllgehalte der Tabakblätter .....	150
4.4.3	Einfluß der Testlösungen auf die Chlorophyllfluoreszenz der unterschiedlichen Blattetagen von <i>Nicotiana</i> .....	151
<b>4.5</b>	<b>Beurteilung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz an <i>Nicotiana</i> als neuer Phytotoxizitätstest.....</b>	<b>153</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>155</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>157</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>166</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Area
CA	Chemische Analyse
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
DIN	Deutsche Industrie Norm
EC	Effective Concentration
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EDX	Energy Dispersive X-ray
FDA	Fluoresceindiacetat
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GRS	Gesellschaft für Anlagen- und Reaktorsicherheit
IP	invarianter Punkt
MTM	Metalltestmedium
MTW	Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient
OECD	Organisation of Economic Cooperation and Development
PAM	Puls-Amplituden-Moduliert
PIPES	Piperazine-N, N'-bis-[2-ethansulfonsäure]
RE	Relative Einheiten
Rfd	Ratio of fluorescence decrease
TA	Technische Anleitung
UTD	Untertagedoponie

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Menschliche Gesellschaften produzierten seit jeher Abfälle. In früheren Zeiten verursachten diese Reststoffe keine oder lediglich geringe Probleme, da die Erde weniger eng besiedelt war. Gemessen an der Bevölkerungszahl traten die Abfälle auch nur in geringen Mengen auf und enthielten vor allem kaum toxische Stoffe. Mit Zunahme der Industrialisierung und dem gleichzeitig einsetzenden Bevölkerungswachstum stiegen die durch Abfälle verursachten Probleme. In der heutigen sehr hoch entwickelten Industriegesellschaft sind viele dieser Probleme noch immer nicht gelöst, ja sogar z.T. noch größer geworden. Heute werden von allen Kulturgesellschaften auf der Erde Abfälle mit unterschiedlichsten Inhaltsstoffen und Eigenschaften produziert. Viele dieser Abfälle sind für andere Lebewesen relativ ungefährlich, doch es werden auch große Mengen von Abfallstoffen freigesetzt, von denen eine große Gefahr für Lebewesen ausgeht. Hierbei handelt es sich um so unterschiedliche Stoffe wie anorganische Schwermetallgemische oder radioaktive Abfälle diversen Ursprungs. Für all diese giftigen Substanzen müssen Vorkehrungen getroffen werden, um die Biosphäre vor ihren schädlichen Einflüssen zu schützen.

Der beste Weg hierzu ist die Vermeidungsstrategie, d.h. die Produktion dieser Stoffe frühzeitig zu verhindern oder zumindest ihre Mengen drastisch zu verringern. Dieser Ansatz wird in immer stärkeren Maße auch wahrgenommen, doch lässt sich in vielen Fällen die Entstehung der Abfälle nicht ganz vermeiden. Deshalb müssen die Problemstoffe entweder einem Recycling unterworfen werden oder, wenn dies nicht möglich ist, langfristig in geeigneten Deponien eingelagert werden. Diese Deponierung kann sowohl direkt, d.h. ohne Vorbehandlung, als auch mit einer entsprechenden Modifizierung, wie z.B. eine Verbrennung oder Zerkleinerung, geschehen. Je nach Gefährdung, die noch von den zu deponierenden Stoffen ausgeht, werden die Abfälle dann in Hausmülldeponien oder Sonderabfalldeponien eingelagert.

Hierbei regelt eine Verordnung, die TA (Technische Anleitung) Abfall, welche Abfälle in obertägigen und welche in untertägigen Deponien eingebracht werden müssen.

Als Untertagedeponien (UTD) werden zur Zeit in Deutschland ausschließlich aufgelassene Salzminen genutzt. Zwar repräsentieren Untertagedeponien eine allgemein anerkannte Möglichkeit zur Endlagerung von Sonderabfällen, bei denen praktisch keine Schadstoffe nach außen dringen können, doch können Störfälle nie

ausgeschlossen werden. Bei der Beurteilung der Sicherheit einer Deponie für unterschiedliche Abfalltypen müssen entsprechende Szenarien berücksichtigt werden. Im Falle der UTD in einer Salzmine entspricht das Eindringen von Wasser in die Lagerräume, ausgelöst durch geologische Veränderungen, einem derartigen "worst case". In diesem Fall kommt es durch Lösen von Salzen aus dem Salzgestein im eingedrungenen Wasser zur Bildung von gesättigten Salzlösungen. Durch den Druck dieser Salzlaugen auf die eingelagerten Abfallbehältnisse oder durch Korrosion kann es zum Kontakt der Salzlösung mit den Abfallstoffen kommen. Dadurch entstehen Abfalleluate mit einem hohen Salzgehalt und gleichzeitig einer hohen Schadstoffkonzentration.

Diese toxischen Abfalleluate können unabhängig von der Deponieform in den Lagerräumen verbleiben oder aber auch diese verlassen. Während der dann folgenden Passage durch das Deckgebirge und verschiedene Bodenschichten kann es zur chemischen Veränderung der Abfalleluate kommen. Auch werden sie vermutlich stark verdünnt. Es existieren jedoch ebenfalls Szenarien, nach denen keine Verdünnung der Eluate bis zu ihrem Erreichen der Biosphäre eintritt (BRASSER, mündliche Mitteilung).

In allen Fällen geht von den Abfalleluaten eine Gefährdung der Biosphäre aus, die im Rahmen der Betrachtungen des "worst case" untersucht werden müssen. Dabei reicht die einfache chemisch analytische Untersuchung der Eluate nicht aus, da diese lediglich Aussagen über die Konzentration von bestimmten Elementen liefern kann, ihre toxische Wirkung jedoch durch synergistische, antagonistische oder additive Wirkungen geprägt ist (TAYLOR 1989, FRANCIS und PETERSEN 1989, STARODUB et al. 1987). Aus diesem Grund müssen für die Beurteilung der Gefahr, die von derartigen Abfalleluaten ausgehen kann, Ökotoxizitätstests durchgeführt werden.

Es existieren bereits Untersuchungen über die Ökotoxizität von Sickerwässern aus Haus- oder Sondermülldeponien (GORDON et al. 1989, CLEMENT et al. 1996, CLEMENT et al. 1997), doch gibt es bisher keine Daten über das toxische Potential von Abfalleluaten, wie sie bei dem möglichen "worst case" in UTDs entstehen können.

Da UTDs in Deutschland ausschließlich in Salzminen betrieben werden, müssen im Rahmen der Ökotoxizitätstests die Abfälle mit Salzlaugen eluiert werden. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß auch das Salz selbst ab einer gewissen Konzentration einen negativen Effekt auf Organismen ausübt. Diese darf jedoch in

den Tests nicht erfaßt werden, bzw. es muß sichergestellt sein, daß die von den Schwermetallen ausgehende Hemmung weit größer ist als die des Salzes. Die Erfassung der hemmenden Eigenschaften der Salze ist nicht erwünscht, da diese auf die natürlichen Salzlagerstätten zurückgeht, bzw. die Salzkonzentration in der Biosphäre im Laufe der Zeit sehr stark verdünnt wird.

Aus diesem Grunde muß bei der Beurteilung der Eignung der Testverfahren und -organismen vor allem auf ihre Salztoleranz geachtet werden. Hierzu muß parallel zur Untersuchung der Eluate stets ein Test zur Wirkung der reinen Salzlaugen auf die eingesetzten Organismen erfolgen.

In der Vergangenheit ist der teilweise große Anteil der Wirkung des Salzes auf einige Testorganismen nicht berücksichtigt worden. Erstmals wurde von WUNDRAM (1995) an zwei Standardtests mit *Lemna* und *Lepidium* die Unterscheidung der Salzwirkung von der Toxizität der Schwermetalle untersucht. Hierzu wurde exemplarisch eine Salzlösung mit einem Schwermetallzusatz und keine Eluate aus authentischen Abfällen verwendet. Wegen der großen Salzempfindlichkeit der beiden Pflanzen konnte keine Unterscheidung zwischen der Wirkung des Salzes und der Schwermetalle in dieser synthetischen Lösung erzielt werden. Aus diesem Grund wurde von WUNDRAM (1995) ein neuer Test auf der Basis der Photosynthese von *Chlamydomonas* zur Untersuchung der Phytotoxizität von salinen Abfalleluaten vorgeschlagen. Mit dieser Methode war die Bestimmung des Schwermetalleffektes möglich.

Da die Tests sowohl mit *Lemna* und *Lepidium* als auch mit *Chlamydomonas* bisher nicht an Eluaten authentischer Abfälle, sondern lediglich an einer Salzlösung mit einem Schwermetallzusatz, durchgeführt worden sind, sollten die bestehenden Untersuchungsergebnisse in dieser Arbeit durch umfangreiche Untersuchungen an salinen Eluaten aus authentischen Abfällen validiert werden. Darüber hinaus sollten neben den bereits genannten Phytotoxizitätstests noch weitere Methoden auf ihre Eignung zur Bewertung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten überprüft werden. Die beschriebenen Voruntersuchungen haben erste Hinweise erbracht, daß der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest sich als geeigneter Test zur Bestimmung der toxischen Wirkung der Schwermetalle in salinen Abfalleluaten erweist, doch gehört er als neuer Test noch nicht zu der Gruppe der Standardtests. Aus diesem Grund muß noch bewiesen werden, daß mit dem *Chlamydomonas*-Photosynthesetest die toxischen Potentiale von Testlösungen ebenso zuverlässig erfaßt werden wie mit

anderen bereits anerkannten Testverfahren. Zur allgemeinen Validierung des *Chlamydomonas*-Photosynthesetests sollte dieser neue Phytotoxizitätstest daher mit den bereits für nicht saline Testlösungen bewährten Phytotoxizitätstests mit *Lemna* und *Lepidium* verglichen werden.

Für diesen Vergleich sollten nicht die salinen Abfalleluate, sondern die von den Abfällen hergestellten Eluate auf der Basis von Grundwasser eingesetzt werden. Diese Grundwassereluat ähneln in ihrer Zusammensetzung den salinen Eluaten auf Basis der Salzlaugen, enthalten jedoch keine hohen Salzkonzentrationen, so daß die salzempfindlichen Testorganismen *Lemna* und *Lepidium* ohne Probleme eingesetzt werden können.

Werden die Wirkungen der Grundwassereluat auf *Chlamydomonas*, *Lemna* und *Lepidium* verglichen, ergeben sich starke Differenzen in den EC<sub>50</sub>-Werten, die auf die unterschiedlichen Wirkweisen der Eluate gegenüber den einzelnen Organismen zurückzuführen sind. Mit dem *Chlamydomonas*-Photosynthesetest kann die direkte Einwirkung der Eluate auf die Photosynthese erfaßt werden, Auswirkungen auf Langstreckentransportprozesse oder die Funktion der Wurzel werden mit diesem Test jedoch nicht erfaßt. Umgekehrt kann z.B. mit dem *Lepidium*-Test der Einfluß auf das Wurzelwachstum detektiert werden, doch Schädigungen des Photosyntheseapparates bleiben unerkannt.

Um die möglichen Ursachen für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der eingesetzten Tests auf die Eluate aufzuzeigen, sollte die Wirkung der Eluate auf Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) als Modellsystem für höhere Landpflanzen untersucht werden. Diese Arbeiten basieren u.a. auf der Messung der Chlorophyllfluoreszenz der Tabakblätter, um Informationen zur Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates zu erhalten. Weiterhin sollten die in den Tabakpflanzen nach der Behandlung mit den Testlösungen enthaltenen Metalle analysiert werden. Hierdurch kann die Aufnahme von Schwermetallen und weiteren Elementen in die Tabakpflanzen nachgewiesen werden. Durch die Mikroskopie der Wurzeln kann dann die Wirkung der Testlösungen auf diese für die Wasser- und Ionenaufnahme wichtigen Organe bestimmt werden.

Parallel zur Analyse der Wirkungsmechanismen sollte überprüft werden, ob sich die Messung der Chlorophyllfluoreszenz an den Tabakpflanzen auch als neuer Test zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten eignet. Ein weiteres Testverfahren für diesen Einsatzbereich ist trotz der großen Zahl der bereits existierenden Methoden

dringend erforderlich, da viele wegen ihrer hohen Salzempfindlichkeit nicht geeignet sind.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde als Methode Schäden am Photosyntheseapparat zu detektieren ausgewählt, da sie vielfältige Aussagen zum Zustand des Photosyntheseapparates der Pflanze liefern kann (SCHREIBER et al. 1994, Bolhar-NORDENKAMPF und ÖQUIST 1993, KRAUSE und WEIS 1991). Weiterhin wird dieses Verfahren schon seit einiger Zeit auch in Phytotoxizitätstests eingesetzt (RENGER und SCHREIBER 1986, SGARDELIS et al. 1994, SAARINEN 1993, LEE et al. 1995).

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz liefert verschiedene Parameter, die jeweils eine Aussage über den Grad des auf die Pflanze einwirkenden Stresses ermöglichen. So weist z.B. die Größe der Parameters  $F_v/F_m$ , der auch als Vitalitätsindex gilt, bei nicht gestressten Pflanzen einen Wert von  $0,832 \pm 0,004$  (BJÖRKMAN und DEMMIG 1987) auf. Werte unterhalb dieses Bereiches deuten daher auf die Hemmung der Photosynthese durch Stressoren hin. Tatsächlich stellte SAARINEN (1993) die Reduktion des  $F_v/F_m$ -Wertes von *Pinus sylvestris* durch Luftschadstoffe wie  $\text{NO}_x$  fest. Doch auch Schwermetallstress führt zur Reduktion der  $F_v/F_m$ -Werte: OUZOUNIDOU (1993) verzeichnete einen starken Abfall dieses Vitalitätsindex durch die Wirkung von Kupfer auf die Photosynthese von *Thlaspi ochroleucum*.

Eine weitere Alternative zur Detektion von Stressfolgen auf den Photosyntheseapparat mit Hilfe der Messung der Chlorophyllfluoreszenz ist die Aufnahme des Rfd (ratio of fluorescence decrease). Nach LICHTENTHALER und RINDERLE (1988) stellt dieser Wert die Näherung an die potentielle photosynthetische Aktivität dar. Der Rfd-Wert wurde bereits als Marker für Schäden am Photosyntheseapparat in Arbeiten zur Ökophysiologie und Stresserkennung eingesetzt (LICHTENTHALER 1988). Auch in Untersuchungen zur Wirkung von Schwermetallen auf Pflanzen spielt der Rfd-Wert eine wichtige Rolle. OUZOUNIDOU (1993) berichtet z.B. von der Reduktion des Rfd-Wertes durch einen Kupfereffekt auf *Silene compacta* und *Thlaspi ochroleucum*.

Diese beiden Parameter machen die Messung der Chlorophyllfluoreszenz zur geeigneten Methode Stressfolgen und Schädigungen des Photosyntheseapparates zu erfassen.

Da es sich bei der Aufnahme der Chlorophyllfluoreszenz um ein nicht destruktives Verfahren handelt, wird die Bestimmung des Zustandes des Photosyntheseapparates ausgewählter Blätter einer Pflanze auch über einen langen Zeitraum hinweg ermöglicht. Die Kombination dieser Untersuchungen mit weiteren Analysen, wie z.B. der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes oder die Mikroskopie der Wurzeln, führt zu wichtigen Erkenntnissen zum Wirkungsmechanismus der Testlösungen.

In dieser Arbeit soll die Eignung von vorhandenen Testsystemen zur Bewertung von toxischen Wirkungen exemplarisch an der Gruppe der UTD-relevanten Abfalleluate untersucht werden. Ziel ist es, die Leistungsfähigkeiten und Grenzen von Phytotoxizitätstests kritisch zu prüfen und darzustellen. In diesem Zusammenhang soll analysiert werden, worauf die Ursachen möglicher Fehlinterpretationen basieren und wie diese zu vermeiden bzw. einzugrenzen sind. Der Vergleich der Untersuchungen kann mögliche Ursachen für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Testverfahren geben. In diesem Zusammenhang kommt der Erfassung der Beeinträchtigung der Photosynthese und der Veränderung der Chlorophyllfluoreszenz eine besondere Aufmerksamkeit zu.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchspflanzen und -algen

#### 2.1.1 Algen

##### *Chlamydomonas-Stamm*

Die Versuche mit *Chlamydomonas reinhardtii* wurden an dem Wildtypstamm W137C (mating type +) durchgeführt. Die Grünalgen stammen aus der Algensammlung von W. T. EBERSOLD und wurden von Dr. J. Voigt, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

##### *Stammhaltung*

Die Stammhaltung der *Chlamydomonas*-Kultur erfolgte auf Agarplatten mit 0,2 % Natriumacetat in anorganischer Nährlösung (SUEOKA et al. 1967). Die Stammplatten wurden bei 15 °C und einem Licht-Dunkel-Programm von 12 Stunden Licht (4000 Lux) - 12 Stunden Dunkel gelagert.

##### *Kulturmedien*

Die Anzucht der Algen erfolgte in einem Metalltestmedium (MTM) (VOIGT, persönliche Mitteilung).

##### *Metalltestmedium*

Das von VOIGT entwickelte MTM (persönliche Mitteilung) wurde getrennt in zwei Komponenten autoklaviert (30 Minuten bei 120 °C), um Präzipitationen in Zuge des Autoklavierens zu vermeiden. Diese beiden Komponenten setzten sich aus MTM-Stammlösungen in den folgenden Volumina zusammen:

##### 1. Lösung:

Aqua dest.	380 mL
Salz-Lösung	50 mL
Spurenelement-Lösung	500 µL
ZnCl <sub>2</sub> -Lösung	500 µL

##### 2. Lösung:

Aqua dest.	10 mL
Puffer-Lösung	50 mL
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung	5 mL
FeEDTA-Lösung	500 µL
CH <sub>3</sub> COONa-Lösung	5 mL

## Zusammensetzung der MTM-Stammlösungen:

Salz-Lösung:

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5	mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	5	mM

Spurenelement-Lösung:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	8	mM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,72	mM
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,067	mM
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,07	mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,01	mM

mit Puffer-Lösung auf pH 6,1 einstellen

ZnCl<sub>2</sub>-Lösung:

ZnCl <sub>2</sub>	0,73	mM
-------------------	------	----

Puffer-Lösung:

Piperazine-N, N'-bis-[2-ethansulfonsäure] (PIPES)	50	mM
---	----	----

mit Kalilauge (2 M) auf pH 6,1 einstellen

(NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung:

(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	750	mM
KCl	750	mM

FeEDTA-Lösung:

Ethylendiamin-tertaacetat (EDTA)	1	mM
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1	mM

CH<sub>3</sub>COONa-Lösung:

CH <sub>3</sub> COONa	150	mM
-----------------------	-----	----

Die Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Das MTM eignet sich besonders gut für Tests, in denen die Wirkung von Metallen auf *Chlamydomonas* untersucht werden soll. Der Vorteil dieses Mediums liegt darin begründet, daß im MTM die Konzentration von einigen Ionen, welche die Aufnahme von Schwermetallen in die Zellen der Algen vermindern können, verringert ist.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil des MTM ist, daß es nur eine geringe Konzentration von Substanzen enthält, die mit Schwermetallen schwerlösliche Verbindungen eingehen oder sie komplexieren, wodurch die Schwermetalle nicht mehr bioverfügbar wären. Im Gegensatz dazu enthalten die meisten Standardmedien eine Vielzahl von Komponenten, die solche Verbindungen mit Schwermetallen bilden können (AYLETT 1979; DEN DOOREN DE LONG 1965; MONAHAN 1976; SILLÉN und MARTELL 1964).

Auch der pH-Wert des Mediums spielt bei Versuchen mit Schwermetallen eine wichtige Rolle, da einige Schwermetalle bei neutralen oder alkalischen pH-Werten in Form von schwerlöslichen Schwermetallhydroxiden oder -salzen ausfallen. Um diesen Effekt zu minimieren, enthält das MTM 5 mM PIPES-Puffer von pH 6,1. Im Gegensatz zu anderen Puffersubstanzen, deren Pufferwirkung im noch saureren pH-Bereich liegt, wird PIPES von Algenzellen nicht aufgenommen und metabolisiert, und es komplexiert auch keine Schwermetalle (EAGLE, 1971; GOOD et al., 1966; GOOD und IZAWA, 1972).

#### *Anzuchtbedingungen*

Die Anzucht der Kulturen für die Versuche erfolgte aseptisch in Erlenmeyerkolben (500 mL in einem 2000 mL Kolben) über 3 bis 4 Tage bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 14 Stunden hell und 10 Stunden dunkel bei ca. 20 °C und einer Beleuchtungsstärke von 60  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ . Die Algen wurden mit Hilfe von Magnetrührern gleichmäßig durchmischt.

#### *Zustand der Algen während der Versuche*

Um die Versuche immer unter reproduzierbaren Bedingungen durchführen zu können, wurden synchronisierte Algenkulturen verwendet, d.h. sämtliche Zellen in einem Kulturgefäß befanden sich in dem gleichen Zellzyklusstadium.

Alle Experimente wurden mit Algenzellen angesetzt, die sich in der Phase des logarithmischen Wachstums befanden. Da die Versuche immer sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase gestartet wurden, konnte davon ausgegangen werden, daß sich die Algen bei allen Tests im gleichen "physiologischen Zustand" befanden.

### **2.1.2 Wasserlinse (*Lemna minor*)**

Die für die Versuche eingesetzte kleine Wasserlinse (*Lemna minor*) wurde aus einem Teich entnommen und vor Beginn der Versuche mehrere Wochen in 2

verschiedenen synthetisch hergestellten Nährlösungen (DEVARE und BAHADIR 1994; WELCH et al. 1993) kultiviert (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Nährlösungen nach DEVARE und BAHADIR 1994 und nach WELCH et al. 1993.

Bestandteil	Welch-Lösung [µM]	Devare/Bahadir-Lösung [µM]
KNO <sub>3</sub>	6000	—
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4000	330
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	—	500
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	1100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	700
MgSO <sub>4</sub>	1000	400
MnSO <sub>4</sub>	2	9,9
ZnSO <sub>4</sub>	2	40,3
CuSO <sub>4</sub>	0,5	2,5
NiSO <sub>4</sub>	0,1	—
FeSO <sub>4</sub>	10	—
CoSO <sub>4</sub>	—	1,3
FeCl <sub>3</sub>	—	11900
KCl	50	—
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25	80
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,5	2

Diese Stammkultur wurde über mehrere Monate bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 14 Stunden hell und 10 Stunden dunkel in Kunststoffwannen gehalten. Um eine gleichmäßige, ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten und ein Algenwachstum gering zu halten, wurde die Nährlösung einmal wöchentlich erneuert. Hierbei wurden die *Lemna*-Pflanzen mit einem Sieb von der Nährlösung getrennt und anschließend mit Leitungswasser gespült.

### 2.1.3 Gartenkresse (*Lepidium sativum*)

Die Samen für die Wurzelwachstumsversuche mit Gartenkresse (*Lepidium sativum*) wurden von Maier-Botana, Bodenkirchen, bezogen.

#### 2.1.4 Pflanzen für den terrestrischen Pflanzenwachstumstest

Die Samen für die terrestrischen Pflanzenwachstumstests (Terrestrial Plants, Growth Test: OECD Guidelines For Testing Chemicals Nr. 208, adopted 04.04.1984) mit Gartenkresse (*Lepidium sativum*), Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*) und Rettich (*Rhaphanus sativus*) wurden von Carl Sperling & Co., Lüneburg bezogen.

#### 2.1.5 Zellkultur von *Nicotiana tabacum*

##### *Stamm*

Die Versuche mit einer Suspensions-Zellkultur von *Nicotiana tabacum* wurden an dem Stamm TX4 durchgeführt, der von Herrn Dr. Berlin, GBF Braunschweig, zur Verfügung gestellt wurde.

##### *Stammhaltung*

Die Stammhaltung der Zellkultur erfolgte als Suspensionskultur in MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG 1962) auf einem Rotationsschüttler (120 U/min) bei 26 °C im Dunkeln. Eine Subkultivierung in frisches Medium erfolgte alle 14 Tage.

Das MS-Medium wurde aus 6 Stammlösungen mit den folgenden Volumina pro 1 L Medium hergestellt und anschließend autoklaviert (30 Minuten, 120 °C):

MS 1-Stammlösung	50 mL
MS 2-Stammlösung	1 mL
MB <sup>+</sup> -Stammlösung	10 mL
Inositol-Stammlösung	10 mL
2,4-D-Stammlösung	1 mL
Fe EDTA-Stammlösung	5 mL

Vor dem Autoklavieren wurde Saccharose in einer Konzentration von 30 g/L zugesetzt und der pH-Wert mit Kalilauge (1 M) auf 5,7 eingestellt.

Zusammensetzung der Stammlösungen:

MS 1-Stammlösung:

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	33,0 g/L
$\text{KNO}_3$	38,0 g/L
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	8,8 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	7,4 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,4 g/L

MS 2-Stammlösung

$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	15,64 g/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2 g/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	12,3 g/L
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	25 mg/L
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mg/L
KJ	380 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	250 mg/L

MB<sup>+</sup>-Stammlösung

Glycin	200 mg/L
Thiamin-HCl	10 mg/L
Nicotinsäure	50 mg/L
Pyridoxin-HCl	50 mg/L

Inositol-Stammlösung

Myo-Inositol	10 g/L
--------------	--------

2,4-D-Stammlösung

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	440 mg/L
------------------------------	----------

Fe EDTA- Stammlösung

$\text{Na}_2\text{EDTA}$	7,45 g/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	5,57 g/L

Die Stammlösungen wurden bei -18 °C gelagert.

### **2.1.6 Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*)**

Die Tabakpflanzen wurden aus Samen der Tabaksorte "Sumatra" aus Cruz das Almas, Bahia, Brasilien, kultiviert. Die Samen wurden von Herrn Dr. Serrano Minar (ehemals Botanisches Institut der Technischen Universität Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Die Samen wurden auf Vermiculite (Vermiculite, Deutsche Dämmstoff GmbH) ausgesät. Nach der Keimung wurden sie vereinzelt und bis zu einem 5- bis 6-Blattstadium auf Vermiculite weiter kultiviert. Anschließend wurden sie in eine Nährlösung nach WELCH et al. (1993) (Kapitel 2.1.2) überführt. Bis zum Beginn der Versuche wurde die Nährlösung jeden zweiten Tag ausgewechselt (in der Regel über die Dauer von einer Woche), um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Pflanzen zu gewährleisten.

Die gesamte Kultivierung erfolgte bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 12 Stunden hell und 12 Stunden dunkel und einer Beleuchtungsstärke von 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ . Die durchschnittliche Luftfeuchtigkeit betrug 65 %.

## **2.2 Untersuchte Abfälle**

### **2.2.1 Art und Herkunft der Abfälle**

Die in dieser Arbeit untersuchten Eluate stammen von 10 Abfallstoffen (Tabelle 2), die nach TA Abfall (1991) wegen ihrer Inhaltsstoffe oder ihres Mengenaufkommens untertage gelagert werden müssen. Es wurden bewußt Abfälle sehr unterschiedlicher Herkunft und Zusammensetzung ausgewählt, um bei den nachfolgenden ökotoxikologischen Untersuchungen auf eine große Zahl verschiedenartiger Proben zurückgreifen zu können.

In Tabelle 2 sind weiterhin die Abfall-Schlüssel der Abfälle nach TA Abfall und die von der Gesellschaft für Anlagen- und Reaktorsicherheit (GRS) in Braunschweig vorgenommene Numerierung angegeben.

**Tabelle 2:** Verwendete Abfälle mit Abfall-Schlüsseln und Numerierung gemäß der chemischen Analyse (CA) der GRS.

CA-Nr.	Abfall-Schlüssel Nr.	Bezeichnung
205	313 16	Feste Pyrolyserückstände
204	515 20	Eisensulfat (Grünsalz)
202	313 11	E-Filterstaub aus Sonderabfallverbrennung
158	313 01	Filterstaub aus Steinkohlekraftwerk
157	313 01 (05)	Filterstaub aus Braunkohlekraftwerk
156	399 04	Gasreinigungsmasse (Leitung außer Betrieb)
155	399 04	Gasreinigungsmasse (Leitung in Betrieb)
153	313 09	Filterstäube aus Hausmüllverbrennung
151	313 08	Aschen und Schlacken aus Hausmüllverbrennung
150	313 08	Aschen und Schlacken aus Hausmüllverbrennung

## 2.2.2 Herstellung der Abfalleluat

### 2.2.2.1 Verwendete Elutionsmittel

Aus den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Abfällen wurden von der GRS Eluate hergestellt. Um angenommene "worst case" Szenarien in einer Untertagedeponie möglichst realistisch nachzustellen, sollten die Abfälle nicht nach DEV S4 mit aqua dest. sondern mit geologisch relevanten Elutionsmitteln eluiert werden.

Bei einem "worst case" in einer Salzstock-UTD wird das eindringende Grundwasser zuerst mit dem den Deponieraum umgebenden Salzgestein in Kontakt treten. Dies führt zur Bildung von Salzlaugen des hexären Systems ozeanischer Salzablagerungen  $[\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{Cl}^- - \text{SO}_4^{2-} - \text{H}_2\text{O}]$ . Dabei werden die Gleichgewichtszusammensetzungen dieses Systems durch invariante Punkte (IP) innerhalb des dazugehörigen Phasendiagramms festgelegt.



Zur Herstellung der Eluate wurden zwei Salzlaugen aus unterschiedlichen invarianten Punkten verwendet. Die erste, eine Halit-Polyhalit-gesättigte Salzlösung ( $\text{NaCl-Ca}_2\text{K}_2\text{Mg}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) liegt im Phasendiagramm bei IP9; die zweite, eine Halit-Polyhalit-Carnallit-Kainit-Sylvin-gesättigte ( $\text{NaCl-KCl-CaSO}_4\text{-MgCl}_2\text{-MgSO}_4$ ) liegt im Phasendiagramm bei IP21.

Da die ausgewählten Salzlaugen nicht in ausreichenden Mengen vorhanden waren, wurden sie von der GRS synthetisch hergestellt. Dabei mußte Calciumsulfat wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit durch äquimolare Mengen Calciumchlorid und Natriumsulfat ersetzt werden. Dies wurde bei der einzusetzenden Menge Natriumchlorid berücksichtigt.

Die Ergebnisse der chemischen Analyse der Salzlösungen sind in Tabelle 3 angegeben. Die gemessenen Konzentrationen weichen geringfügig von den eingewogenen Mengen der Komponenten ab.

Neben Untertagedeponien in Salzstöcken sind jedoch auch Untertagedeponien in aufgelassenen Steinkohlebergwerken und Tongruben möglich. Bei diesen Deponien wird es im "worst case" zum Kontakt von natürlichem Grundwasser mit den eingelagerten Abfällen und somit zur Bildung von Grundwassereluat kommen. Aus diesem Grund sind auch Abfalleluate auf der Basis eines natürlichen Grundwassers vom Ca-Mg-SO<sub>4</sub>-Typ aus Freiberg in Sachsen hergestellt worden. Das Grundwasser wurde beim Erreichen einer seitlichen Öffnung im Berg entnommen, nachdem es schon teilweise mit Oberflächenwasser versetzt war. Die für ein natürliches Grundwasser hohe Zinkkonzentration ist auf diese Vermischung zurückzuführen. Die Elementzusammensetzung des Grundwassers ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Analysen zur Elementzusammensetzung und pH-Werte der verwendeten Elutionsmittel (IP9- und IP21-Salzlauge, Grundwasser aus Freiberg). Aufgrund der starken Störungen durch die hohen Salzgehalte in der IP9- und der IP21-Lösung beträgt die Nachweisgrenze der Analyse hier 5 mg/L, für das Grundwasser mit nur einem geringen Salzgehalt beträgt sie 0,5 mg/L.

Element	IP9-Lösung (pH-Wert: 7,2) [mg/L]	IP21-Lösung (pH-Wert: 6,1) [mg/L]	Grundwasser (pH-Wert: 4,3) [mg/L]
Al	< 5	< 5	28,9
As	< 5	< 5	< 0,5
B	< 5	< 5	< 0,5
Ba	< 5	< 5	< 0,5
Ca	190	30,5	151
Cd	< 5	< 5	0,82
Co	< 5	< 5	< 0,5
Cr	< 5	< 5	< 0,5
Cu	< 5	< 5	1,27
Fe	< 5	< 5	< 0,5
Hg	< 5	< 5	< 0,5
K	31.900	23.000	7,23
Mg	23.800	95.700	70,0
Mn	< 5	< 5	20,7
Mo	< 5	< 5	< 0,5
Na	90.900	9.000	44,1
Ni	< 5	< 5	0,36
P	< 5	< 5	< 0,5
Pb	< 5	< 5	< 0,5
S	11.100	7.900	289
Sn	< 5	< 5	< 0,5
Sr	< 5	< 5	0,32
Ti	< 5	< 5	< 0,5
V	< 5	< 5	< 0,5
Zn	< 5	< 5	72,6

### 2.2.2.2 Kaskadenelution

Um das Auslaugen der Abfälle über einen langen Zeitraum in einer gefluteten Untertagedeponie zu simulieren (in Anlehnung an VERSLUIJS et al. 1988), wurde eine Kaskadenelution der Abfälle vorgenommen. Dazu wurden 200 g Abfall (auf Trockensubstanz bezogen) und 1000 mL Elutionsmittel in einer 2-Liter-PE-Flasche

24 Stunden über Kopf geschüttelt (1 Umdrehung pro Minute) und anschließend durch einen 0,45 µL Membranfilter filtriert. Dann wurden 850 mL des Filtrats mit 170 g neuem getrocknetem Abfall versetzt und wiederum geschüttelt. Diese Kaskadenelution wurde in den meisten Fällen bis zur siebten Kaskade wiederholt, dabei wurde immer ein konstantes Feststoff:Elutionsmittel-Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Teilweise übte der Abfall jedoch eine so starke Elutionsmittelbindung aus, daß keine sieben Kaskaden erreicht werden konnten. Die Anzahl der Kaskaden für die einzelnen Eluate ist in Tabelle 4 angegeben. Vom Abfall Nr. 205 und 156 standen nur sehr geringe Mengen zur Verfügung, so daß sie nicht mit allen drei Elutionsmitteln eluiert werden konnten. Daher wurde Abfall Nr. 205 nur mit der IP9-Lösung und Abfall Nr. 156 nur mit der IP9-Lösung und Grundwasser eluiert.

**Tabelle 4:** Höchste bei der Elution der verschiedenen Abfälle erzielte Kaskadenstufe

CA-Nr.	Bezeichnung des Abfalles	höchste erzielte Kaskadenstufe		
		IP9	IP21	Grundwasser
205	Feste Pyrolyserückstände	7	—	—
204	Eisensulfat (Grünsalz)	7	7	7
202	E-Filterstaub aus Sonderabfallverbrennung	7	3	3
158	Filterstaub aus Steinkohlekraftwerk	7	7	7
157	Filterstaub aus Braunkohlekraftwerk	7	7	7
156	Gasreinigungsmasse (Leitung außer Betrieb)	7	—	7
155	Gasreinigungsmasse (Leitung in Betrieb)	7	2	7
153	Filterstäube aus Hausmüllverbrennung	7	3	6
151	Aschen und Schlacken aus Hausmüllverbrennung	7	5	7
150	Aschen und Schlacken aus Hausmüllverbrennung	7	5	7

—: Eluat nicht vorhanden

Die Eluate wurden bei 4 °C und künstlicher Beleuchtung (Neonröhren, Lichtstärke 2  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) gelagert. Hierbei gebildete Niederschläge wurden vor Verwendung eines Eluates durch Rühren und Erwärmen aufgelöst.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Auswirkung des pH-Wertes auf die Testorganismen ausschließen zu können, wurde der pH-Wert der Eluate vor ihrer Verwendung auf pH 6,1 eingestellt. Dies entspricht dem pH-Wert, der sich optimal für die beiden Tests mit *Chlamydomonas* eignet.

Die Bezeichnung der einzelnen Eluate in den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen setzten sich zusammen aus der Abfallnummer (z.B. 205 für die festen Pyrolyserückstände) gefolgt von dem jeweiligen Elutionsmittel (IP9 bzw. IP21 für die Salzlauge und GW für Grundwasser), also z.B. 205-IP9.

### **2.2.2.3 Mit Schwermetallen dotierte IP21-Lauge**

Die Prüfung einer grundsätzlichen Eignung einiger Tests (Terrestrischer Pflanzenwachstumstest, Zellkultur-Wachstumstest) erfolgte an einer Testlösung auf Basis der IP21-Lauge. Zur Herstellung dieser Testlösung wurden einzelne Schwermetallsalze ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  und  $\text{NiCl}_2$ ) zu einer bereits vorher 1:10 (V:V) verdünnten IP21-Lauge dotiert und 24 Stunden lang in einem verschlossenen Polyethylengefäß gerührt, um die Lösungsgleichgewichte einzustellen. (Alle im weiteren Verlauf angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die unverdünnte IP21-Lösung.) Der entstandene Niederschlag (hauptsächlich Bleichlorid und -sulfat, MÜLLER, persönliche Mitteilung) wurde mit 0,45  $\mu\text{m}$  Membranfiltern abgetrennt.

Die Schwermetallkonzentration dieser dotierten IP21-Lauge entspricht den von REICHELT et al. (1995) in IP21-Eluaten von Rückständen aus der Abfallverbrennung durchschnittlich ermittelten Schadstoffmengen.

Die eingewogenen und gemessenen Konzentrationen der Komponenten der dotierten IP21-Lauge sind in Tabelle 5 angegeben.

**Tabelle 5:** Eingewogene und gemessene Schwermetallkonzentrationen der dotierten und der undotierten IP21-Lauge im Vergleich

Element	dotierte IP21		undotierte IP21
	Berechnet nach Einwaage der Salze (mg/L)	gemessen (mg/L)	gemessen (mg/L)
B	0,0	< 5	< 5
Ca	25,0	27,2	30,5
Cd	103	94,5	< 5
Cu	10,0	9,96	< 5
Fe	0,0	< 5	< 5
K	25.000	19.600	23.000
Mg	99.000	93.400	95.700
Mn	0,0	< 5	< 5
Mo	0,0	< 5	< 5
Na	10.700	9.560	9.000
Ni	515	296	< 5
P	0	< 5	< 5
Pb	5.150	2.340	< 5
S	9.100	8.670	7.900
Sr	0,0	< 5	< 5
Zn	5.150	4.970	< 5

#### 2.2.2.4 Mit Schwermetallen dotiertes aqua dest.

Um die toxischen Effekte von hohen Salzkonzentrationen von den Schädigungen durch die Schwermetalle zu differenzieren, wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen die Schwermetalle in einer nicht-salinen Lösung vorlagen. Die Pflanzen wurden in einer Welch-Nährlösung (Kapitel 2.1.2, Tabelle 1) mit und ohne Zusatz von Schwermetallen kultiviert. Die Schwermetalle wurden zunächst in aqua dest. gelöst und anschließend zur Nährlösung zugesetzt. Die Herstellung der Testlösung verlief analog zu der dotierten IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3), d.h. die Schwermetallsalze wurden in gleichen Konzentrationen wie im Falle der dotierten IP21-Lauge zu aqua dest. eingewogen. Anschließend wurde wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben weiterverfahren.

### 2.2.2.5 Herstellung der Testlösungen mit Zusätzen von Rückständen aus gefriergetrocknetem Leitungswasser

In einem Versuch (Kapitel 3.2.6) ist der Einfluß der verwendeten Hydrokulturlösung auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium sativum* analysiert worden. Es sollte untersucht werden, ob sich im verwendeten Leitungswasser eine Substanz befindet, die zu einer Verlängerung der *Lepidium*-Wurzeln führt. Dazu wurden verschiedene Volumina Leitungswasser gefriergetrocknet und mit einer definierten Menge an Welch-Nährlösung bzw. aqua dest. aufgefüllt. Eine Welch-Nährlösung mit z.B. 25 % Leitungswasser wurde wie folgt hergestellt: 25 mL Leitungswasser wurden gefriergetrocknet und mit 100 mL Welch-Nährlösung aufgefüllt. Auf diese Weise entstanden Lösungen, die einen Anteil von 25, 50, 75 und 100 % an Rückständen aus gefriergetrocknetem Leitungswasser enthielten.

Nach Herstellung dieser Lösungen erfolgte ein Standardtest mit *Lepidium sativum*, in dem die Wirkungen der oben beschriebenen Lösungen mit denen von reiner Welch-Nährlösung, Leitungswasser und aqua dest. auf die Wurzellänge untersucht wurden.

## 2.3 Phytotoxizitätstests

### 2.3.1 Bestimmung der Photosyntheserate von *Chlamydomonas*

Dieser Test beruht auf der Hemmung der Photosyntheseleistung von *Chlamydomonas reinhardtii* durch toxische Testlösungen (WUNDRAM et al. 1996).

Die Algen wurden für alle Versuche auf eine Zellzahl von  $10^7$  Zellen/mL eingestellt. Hierzu wurde zunächst die Zellzahl mit einer THOMA-Zählkammer bestimmt. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der Algen vom Medium durch Zentrifugation (5 min bei  $2000 \cdot g$ ) bevor die Algen in einem errechneten Volumen an Medium (5 mM PIPES in Leitungswasser, pH 6,1 mit Natronlauge (2 M) eingestellt) resuspendiert wurden.

Diese Algensuspension (2,5 mL) wurde bei einer Beleuchtungsstärke von  $150 \mu E/m^2 \cdot s$  und bei 25 °C mit den Testlösungen vorinkubiert. Im Falle von Testlösungen mit sehr geringer Toxizität wurden die Algen nach dem Zentrifugieren direkt in diesen Lösungen, nach eventueller Verdünnung mit PIPES (pH 6,1, in Leitungswasser), resuspendiert. Um eine möglichst große Beleuchtungsoberfläche zu schaffen, wurden die Reagenzgläser um 45° geneigt und von oben senkrecht zur Tischplatte beleuchtet. Einmal pro Stunde erfolgte eine Durchmischung der Algensuspension

durch Schütteln, um sedimentierte Zellen wieder zu resuspendieren. Nach der Inkubation erfolgten die Messungen der Atmungsrate und der apparenten Photosyntheserate der Algen.

Hierzu wurde die Änderung des Sauerstoffgehaltes der Algensuspensionen mit einer Sauerstoffelektrode polarographisch bestimmt. Die Kalibrierung der Sauerstoffelektrode auf 100 % Sauerstoffsättigung erfolgte mit temperiertem Wasser, das zuvor mindestens 30 Minuten lang mit Luft begast wurde.

Alle Messungen erfolgten in den Meßküvetten der Sauerstoffmeßeinrichtung. Um die Änderungen des Sauerstoffgehaltes reproduzierbar erfassen zu können, wurden die Messungen im Bereich der Sauerstoffsättigung von 40 bis 60 % durchgeführt. Dazu wurde direkt vor der Messung der Sauerstoffgehalt der zu messenden Lösungen durch Begasung mit Stickstoff herabgesetzt.

Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 30 °C und einer Beleuchtungsstärke von 150  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ .

### 2.3.2 Fluoresceindiacetattest mit *Chlamydomonas*

Wie die Zellen höherer Pflanzen oder Tiere, nehmen auch Algenzellen den Farbstoff Fluoresceindiacetat (FDA) auf. In den Zellen wird FDA durch Esterasen hydrolysiert. Das dabei entstehende Fluorescein fluoresziert bei Bestrahlung grün-gelb ( $\lambda_{\text{max ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{max em}} = 520 \text{ nm}$ ). Die Intensität der so erzeugten Fluoreszenz kann als Indikator für die Vitalität genutzt werden und stellt somit die Basis für einen sehr sensitiven Ökotoxizitätstest dar (GILBERT et al. 1992; BENTLEY-MOWAT 1982; DORSEY et al. 1989). Die Fluoreszenzintensität des Testansatzes wird hierbei nicht nur durch die Aktivität der Esterasen beeinflusst, sondern auch durch die Hemmung der Aufnahme des FDA in die Zellen.

Die Algenzellen wurden durch Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt (5 min 2000 • g) und in 5 mM PIPES (pH 6,1, in Leitungswasser) bis zu einer definierten Zellkonzentration von  $10^6$  Zellen/mL resuspendiert. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,1 wurde die Algensuspension mit Schwermetall- bzw. Salzlösungen versetzt. Die Ansätze wurde mit PIPES (pH 6,1, in Leitungswasser) auf ein Volumen von 1,1 mL aufgefüllt. Wenn die Testlösungen nur wenig toxisch waren, wurden die Algen nach dem Zentrifugieren nicht mit PIPES, sondern direkt mit den verdünnten Testlösungen (pH 6,1) resuspendiert.

Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Testlösungszugabe. Der pH-Wert abhängige Zerfall von FDA wurde berücksichtigt, indem die Fluoreszenzintensität einer Probe in reinem Puffer (ohne Algen- und Testlösungszusatz) von der Fluoreszenzintensität der Kontrolle subtrahiert wurde.

Die Proben wurden insgesamt 4 Stunden lang in Reagenzgläsern unter Raumlichtbedingungen ( $20\text{-}30\text{ }\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) inkubiert. Einmal pro Stunde wurde die Algensuspension geschüttelt, um sedimentierte Zellen wieder zu resuspendieren. Nach 2,5 Stunden erfolgte die Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  FDA-Lösung in Aceton (0,2 % w/v). Die Fluoreszenzintensität des gebildeten Fluoresceins wurde an einem Fluoreszenzspektrophotometer (Hitachi F-3000) bestimmt (Anregung 490 nm, Emission 520 nm).

### **2.3.3 Wachstumstests mit *Lemna* und *Lepidium***

Die Versuche mit *Lemna* und *Lepidium* erfolgten in einer bei DEVARE und BAHADIR (1994) bzw. mit einer bei WELCH et al. (1993) beschriebenen Nährlösung (Zusammensetzung beider Lösungen: Kapitel 2.1.2, Tabelle 1), der die Testlösungen in verschiedenen Konzentrationen zugefügt wurden.

Zur Herstellung dieser Nährlösungen wurde eine doppelt konzentrierte Stammlösung erstellt, der dann verschiedene Volumina der Testlösungen (Kapitel 2.2) zugefügt wurden. Anschließend wurde mit aqua dest. bis zum Erreichen der einfachen Nährstoffkonzentration aufgefüllt.

Für den Kontrollansatz ohne Schwermetalle wurde die doppelt konzentrierte Stammlösung mit aqua dest. 1:2 verdünnt.

Da der Säuregrad der untersuchten Flüssigkeit nicht dem der Stammlösung entsprach, änderte sich in der Regel mit steigender Konzentration der zu testenden Lösung im Ansatz auch der pH-Wert.

Um mögliche Effekte des pH-Wertes auf das Pflanzenwachstum auszuschließen, wurden alle Ansätze einheitlich mit Salzsäure (1 M) bzw. Natronlauge (1 M) auf pH 6,1 eingestellt.



### 2.3.3.1 *Lemna*-Blattwachstumstest

Dieser Test beruht auf der Beeinflussung der Blattvermehrung von *Lemna minor* durch toxische Substanzen und wurde in Anlehnung an die Methode von DEVARE und BAHADIR (1994) durchgeführt.

Zu 40 mL der Nährlösung, die verschiedene Anteile der Testlösungen enthielt, wurden in einem 100 mL Becherglas 20 *Lemna*-Blätter in Gruppen von zwei bis vier Blättern gegeben. Die Kontrolle erfolgte mit Nährlösung ohne Zusatz einer Testlösung. Die Bechergläser wurden acht Tage lang bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden hell und 8 Stunden dunkel, bei 25 °C und einer Beleuchtungsstärke von 35  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  gehalten. Täglich wurde die Blattzahl bestimmt und das verdunstete Wasser mit aqua dest. aufgefüllt.

Die Zunahme der Blattanzahl verläuft exponentiell, so daß sich näherungsweise eine Gerade ergibt, wenn der natürliche Logarithmus der Blattzahlen gegen die Zeit aufgetragen wird. Die Steigung der Geraden stellt ein umgekehrtes Maß der Hemmung der Blattzahlzunahme dar, d.h. je steiler die Gerade verläuft, desto geringer ist die Hemmung.

Die Steigung wird als mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient bezeichnet, der für jede Konzentration der Testlösung berechnet werden kann.

### 2.3.3.2 Wurzellängentest mit *Lepidium sativum*

Dieser Test beruht auf einer Hemmung des Wurzellängenwachstums von *Lepidium sativum* durch toxische Substanzen. Er wurde in Anlehnung der bei DEVARE und BAHADIR (1994) beschriebenen Methode durchgeführt.

Kleine Kulturröhrchen wurden mit je 11 mL einer Nährlösung, die verschiedene Anteile der Testlösungen enthielt, befüllt. Als Kontrollansatz wurden Röhrchen mit Nährlösung ohne Zusatz von Testlösungen verwendet. In die Röhrchen wurde ein auf eine Größe von 3 mal 3 cm ausgeschnittenes Nylonnetz eingebracht und mit einem 4 cm langen Gummischlauch so fixiert, daß die Maschen des Netzes gerade in die Lösung eintauchten.

In diese Vorrichtung wurden je drei Kressesamen zum Keimen plaziert. Nach der Keimung wurden zwei der drei Sämlinge entfernt, so daß sich nur noch ein Keimling im Röhrchen befand. Der anfängliche Einsatz von drei Samen gewährleistet, daß

auch bei ausbleibender Keimung einiger Samen immer ein Same pro Ansatz zur Verfügung steht.

Diese Versuchsanordnung wurde acht Tage bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 Stunden hell und 8 Stunden dunkel, bei 25 °C und einer Beleuchtungsstärke von 35  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  gehalten. Das verdunstete Wasser wurde täglich mit aqua dest. aufgefüllt. Nach acht Tagen wurde die Länge der Hauptwurzel der Kressepflanzen ausgemessen.

#### **2.3.4 Terrestrischer Pflanzenwachstumstest (Terrestrial Plants, Growth Test)**

Dieser Test erfolgte gemäß der Richtlinie der "OECD Guidelines For Testing Chemicals Nr. 208, adopted 04.04.1984". Er basiert auf einer meßbaren Wachstumsreduktion von Pflanzen durch toxische Substanzen. Standardboden (LUFA 2.2) wurde in Töpfen mit 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität an Testlösungen verschiedener Konzentrationen bzw. aqua dest. (Kontrolle) versetzt. Je 5 Samen von Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*), Rettich (*Raphanus sativus*) und Gartenkresse (*Lepidium sativum*) wurden in den vorbereiteten Boden ausgesät. Die Pflanzen wurden bei 21 °C und 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  kultiviert und dabei täglich mit 2 mL Leitungswasser gegossen. 14 Tage nach der Keimung wurden die oberirdischen Pflanzenteile geerntet und das Frisch- und Trockengewicht (nach Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C) bestimmt.

#### **2.3.5 Zellkultur-Wachstumshemmtest**

Die Wachstumshemmtests wurden mit *Nicotiana*-Zellkulturen durchgeführt, die sich im exponentiellen Wachstumsstadium (10 Tage nach einer Subkultivierung) befanden. Nachdem die Zellen mit einem Sieb vom Medium getrennt worden waren, wurden je 0,75 g Zellen (Frischmasse) mit 70 mL vorbereitetem Medium in einen 250 mL Erlenmeyerkolben gegeben. Dabei wurde reines MS-Medium als Kontrolle und mit Testlösung in verschiedenen Volumenanteilen versetztes MS-Medium eingesetzt. Die Volumenvergrößerung durch die Testlösung wurde bei der Herstellung des Mediums durch eine entsprechende Reduktion von aqua dest. ausgeglichen. Die so vorbereiteten Ansätze wurden 10 Tage auf einem Rotationsschüttler (120 U/min) bei 26 °C im Dunkeln kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung

der Frischmasse. Hierzu wurden die Zellen durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt und gewogen.

### 2.3.6 Chlorophyllfluoreszenz von *Nicotiana tabacum*

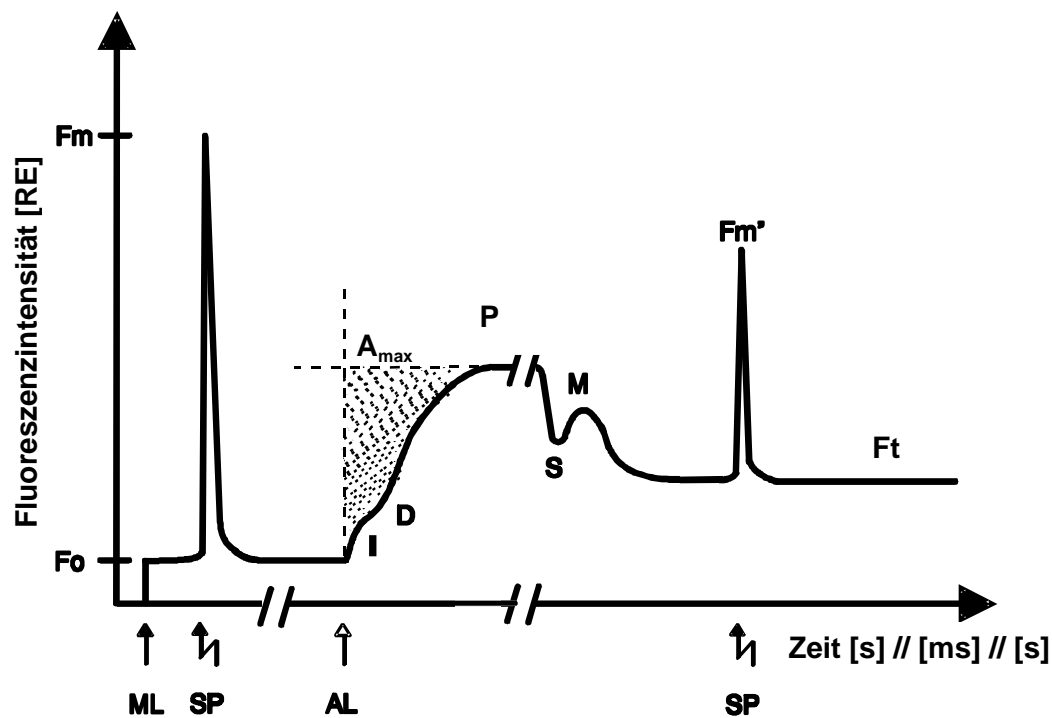
Der Photosyntheseapparat und speziell Photosystem II reagiert sehr sensibel auf eine Störung durch vielfältige Streßfaktoren, wie z.B. Trockenheit, Herbizide, Schwermetalle, Luftverunreinigungen, Hitze und Kälte. Eine Methode, mit der geringste Schädigungen des Photosyntheseapparates dokumentiert werden können, stellt die Messung der Chlorophyllfluoreszenzkinetik dar. Nahezu jede Beeinträchtigung der Photosyntheseleistung, unabhängig von ihrer Position, spiegelt sich in einer Veränderung eines meßbaren Parameters der Chlorophyllfluoreszenz wider. Darüber hinaus bietet diese Meßmethode den Vorteil, daß kontinuierliche Untersuchungen, ohne einen zerstörenden Eingriff in die Pflanze, erfolgen können.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wird bereits seit einiger Zeit auch als Ökotoxizitätstest angewendet. Dabei wurde in den meisten Fällen der schädigende Einfluß von Herbiziden und Luftverunreinigungen auf Pflanzen untersucht, doch auch Effekte hervorgerufen durch Salz- und Schwermetallbelastung spielen bereits bei der Anwendung der Chlorophyllfluoreszenz als Meßmethodik eine Rolle.

Ein Photon von rotem Licht (670 nm) enthält genügend Energie um ein Chlorophyllmolekül in den ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) zu versetzen. Das angeregte Chlorophyllmolekül ist nur für weniger als  $10^{-8}$  s stabil. In dieser Zeit kann es zur Ladungstrennung im Reaktionszentrum kommen, dem ersten Schritt der Photochemie. Wenn es nicht zur Ladungstrennung gekommen ist, wird die aufgenommene Lichtenergie als Fluoreszenz und/oder Wärme wieder abgegeben. Unter Schwachlichtbedingungen, wenn eine große Quantenausbeute erzielt werden kann, können 97 % der auf das Blatt treffenden Photonen für photochemische Prozesse verwendet werden, während etwa 0,5 % als rotes Fluoreszenzlicht re-emittiert werden. Im Gegensatz dazu können unter Starklichtbedingungen, wenn alle Reaktionszentren des Photosystems gesättigt sind, 95-97 % der absorbierten Energie als Wärme und 2,5-5 % als Fluoreszenz wieder abgegeben werden.

### Die Kautsky-Kurve

Wird ein dunkeladaptiertes Blatt mit photosynthetisch nutzbarem Licht (aktinisches Licht) bestrahlt, so zeigt sich eine charakteristische Änderung des abgegebenen Fluoreszenzlichtes, eine sogenannte Fluoreszenzinduktionskurve (die Kautsky-Kurve). Diese Kurve zeigt einen sehr charakteristischen Verlauf, in dem bestimmte Phasen (I, D, P, S, und M) durchlaufen werden (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Fluoreszenzinduktionskurve (Kautsky-Kurve).**

Fo: Grundfluoreszenz, Fm: maximale Fluoreszenz, Fv:  $F_m - F_o$ , Ft: terminale Fluoreszenz, die markierte Fläche kennzeichnet  $A_{max}$ , die Punkte I, D, P, S, M) werden im Text erläutert. ML: Meßlicht, SP: sättigender Puls, AL: aktinisches Licht

Der Anstieg der Fluoreszenz zum Punkt P erfolgt in den ersten Sekunden der Beleuchtung und wird als "schnelle Kinetik" bezeichnet. Während es in der "langsamen Kinetik" mehrere Minuten dauert bis die terminale Phase T erreicht ist.

Bei Belichtung eines dunkeladaptierten Blattes mit Meßlicht kommt es zu einer Fluoreszenz ( $F_o$ ) (Abbildung 1). Diese wird erreicht, wenn Licht von den Chlorophyllantennen absorbiert wird, bevor die Reaktionszentren des Photosystems II angeregt wurden.

Nach Belichtungsbeginn mit aktinischem Licht steigt die Fluoreszenzintensität weiter an. Dabei wird über die Zwischenstufe (intermediate level, I) und die Schulter (dip, D) das Maximum (peak, P) erreicht. Dieser Anstieg der Fluoreszenzintensität spiegelt

eine fortschreitende Reduzierung des Plastochinonpools wieder, wodurch der Anteil der Photochemie an den Gesamtreaktionen immer geringer wird. An der Zwischenstufe kommt es nach einem steilen Anstieg der Fluoreszenz kurzzeitig zu einem Abflachen der Kurve, da Elektronen erstmals vom schon teilweise reduzierten QA an QB weitergegeben werden. Daher kommt es zu einer vorübergehenden Oxidation von QA, was dazu führt, daß die Fluoreszenzintensität langsamer ansteigt. Zwischen Punkt D und P erfolgt wieder ein steiler Anstieg der Fluoreszenzintensität, bis am Punkt P sowohl QA und QB als auch der gesamte Plastochinonpool abhängig von der Intensität des aktinischen Lichtes völlig oder nur teilweise reduziert sind. Nach Erreichen des Peaks sinkt die Fluoreszenzintensität wieder, da es zur Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  kommt. Durch die Weitergabe der Elektronen werden die Stationen vor dem Plastochinonpool nun oxidiert und die Reaktionszentren des Photosystems II können wieder Elektronen an die Elektronentransportkette abgeben. Am Punkt M kommt es dann zu einem Zwischenpeak, da das gesamte  $\text{NADP}^+$  nun reduziert ist. Nach Einsetzen des Calvin-Zyklus und somit erneuter Oxidation des gebildeten  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  ist ein ungehinderter Transport der Elektronen über die gesamte Elektronentransportkette gewährleistet. Die Fluoreszenzintensität sinkt wieder und es stellt sich eine bestimmte Fluoreszenzintensität des Gleichgewichtszustandes ein ( $F_t$ ).

Das Puls-Amplituden-Modulierte (PAM)-Fluorimeter kann diesen gesamten Verlauf der Fluoreszenzinduktionskurve aufnehmen und ermöglicht die Messung einer Reihe von Parametern, die vielfältige Aussagen über den Zustand einer Pflanze (auch im Hinblick auf die Auswirkung von Stressoren wie Trockenheit, Schwermetall- oder Salzbelastung) ermöglichen.

Das Verfahren, das angewendet wird, ist die Sättigende Puls Methode. Hierbei wird ein kurzer, sättigender Lichtpuls auf das dunkeladaptierte Blatt emittiert, der bewirkt, daß sämtliche Photosystem II Reaktionszentren sofort reduziert (geschlossen) werden und die Fluoreszenzintensität daher einen Maximalwert erreicht, der  $F_m$  (Abbildung 1) genannt wird. Hierbei ist  $F_m - F_o$  als  $F_v$ , die variable Fluoreszenz, definiert. Der Quotient  $F_v/F_m$  bildet den sogenannten Vitalitätsindex (BJÖRKMANN und DEMMING 1987). Dies ist eine Größe, die für die verschiedensten Pflanzen unter Optimalbedingungen einen Wert von  $0,832 \pm 0,004$  annimmt und näherungsweise ein Maß für die optimale Quantenausbeute der Photosynthese darstellt. Sinkt der

Wert für  $F_v/F_m$ , so liegt eine Photoinhibierung vor, die bei Streßexperimenten primär durch die Einwirkung der Stressoren hervorgerufen wird.

Wird ein sättigender Lichtpuls während der Beleuchtung mit aktinischem Licht appliziert, so steigt die Fluoreszenzintensität auch an, jedoch nicht bis zum  $F_m$ -Wert sondern nur bis  $F_m'$  (Abbildung 1). Das bedeutet, daß ein Teil der Fluoreszenz gelöscht wurde.

Fluoreszenz kann durch zwei verschiedene Vorgänge gelöscht werden: Zum Einen durch photochemisches Löschen, d.h. angeregte Chlorophyllmoleküle geben ihre Energie an weitere Komponenten der Elektronentransportkette ab.

Zum Zweiten durch nicht-photochemisches Löschen, d.h. die Fluoreszenz verringert sich, da die Energie auf eine andere Weise umgesetzt wird. Zu Vorgängen, die ein nicht-photochemisches Löschen verursachen, gehört in erster Linie die sekundäre Veränderung der Anordnung der Pigment-Protein-Komplexe.

Durch einen sättigenden Lichtpuls werden alle Reaktionszentren reduziert und es ist kein photochemisches Löschen mehr möglich. Dies bedeutet, daß die Differenz  $F_m - F_m'$  durch die nicht-photochemische Löschung verursacht wird. Je größer die nicht-photochemische Löschung wird, desto größer wird auch der Anteil von Prozessen, die nicht zur photochemischen Nutzung des Lichtes führen, d.h. desto ineffektiver arbeitet der Photosyntheseapparat.

Dies wird bei der Bestimmung einer weiteren wichtigen Meßgröße, genannt "Yield", ausgenutzt. "Yield" bildet eine Näherung für die effektive Quantenausbeute im Licht. Die Formel für die Errechnung von "Yield" lautet:

$$\text{Yield} = (F_m' - F_t) / F_m' \quad (1)$$

Der Wert für "Yield" sinkt, wenn die Konzentration der offenen QA-Moleküle abnimmt, oder wenn sich die Energieaufnahmeeffizienz der offenen Reaktionszentren reduziert. Daher stellt "Yield" eine wichtige Größe dar, die sich bei Einwirkung von Stressoren verringert.

Besonders bei Experimenten zur Streßphysiologie spielt noch ein weiterer Parameter eine wichtige Rolle: der Vitalitätsindex-Faktor Rfd (Ratio of fluorescence decrease, nach LICHTENTALER und RINDERLE (1988)). Eine Schädigung des Photosyntheseapparates von Pflanzen führt zu einer Reduktion des Rfd-Wertes:

$$Rfd=(Fm-Ft)/Ft \quad (2)$$

Weiterhin wird der Parameter  $Area_{max}$  ( $A_{max}$ ) (Abbildung 1) in Experimenten zur Streßphysiologie eingesetzt (BOLHÄR-NORDENKAMPF und ÖQUIST, 1993).  $A_{max}$  stellt ein Maß für die Größe der Fläche zwischen der Kurve, die bei der Messung der schnellen Kinetik ermittelt wird, und der  $Fm$ -Linie dar. Die Messung der Fläche  $A_{max}$  führt zu Erkenntnissen über die Konzentration an intakten Photosystem II Reaktionszentren und anderen Komponenten der Elektronentransportkette. Je kleiner  $A_{max}$  wird, desto größer sind die Zerstörungen an der Elektronentransportkette.

#### *Durchführung der Ökotoxizitätstests an *Nicotiana tabacum**

Nach der oben beschriebenen Adaptationsphase (7 Tage) an die Nährlösung erfolgte die weitere Kultivierung der Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) in der Nährlösung nach WELCH et al. (1993) (Kapitel 2.1.2, Tabelle 1), zu der, mit Ausnahme der Kontrollen, auch Testlösungen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurden. Der pH-Wert aller Ansätze wurde auf pH 6,1 eingestellt, um eine Auswirkung des pH-Wertes auf das Versuchsergebnis auszuschließen.

Eine Erneuerung der Lösungen erfolgte alle 2 Tage. Somit standen den Pflanzen zu jeder Zeit ausreichend Nährstoffe zur Verfügung und Nährstoff/Schadstoffverschiebungen durch unterschiedlich starke Transpiration konnten weitgehend ausgeschlossen werden. Je nach Versuch wurde die Chlorophyllfluoreszenz aller Blätter einer Pflanze oder nur des Blattes mit der Insertionsnummer 5 gemessen.

Die Chlorophyllfluoreszenz der Tabakpflanzen wurde mit dem Fluorometer PAM-2000 (Firma Walz, Effeltrich) mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Intensität des Meßlichtes (Rotlicht der Wellenlänge 655 nm):

Stufe 6 (0,3  $\mu E/m^2 \cdot s$ )

Intensität des aktinischen Lichtes (Rotlicht der Wellenlänge 655 nm):

Stufe 6 (40  $\mu E/m^2 \cdot s$ ) bzw. 10 (205  $\mu E/m^2 \cdot s$ )

Intensität des sättigenden Lichtpulses (Wellenlänge <710 nm):

Stufe 6 (ca. 3700  $\mu E/m^2 \cdot s$  für 0,8 s, alle 60 s)

Intensität des Infrarotlichtes (Wellenlänge 700 nm):

Stufe 8 ( $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  für 20 s)

Verstärkung:

Stufe 3

Dämpfung:

Stufe 5

Bestimmung der **A<sub>max</sub>-Werte** der “schnellen Kinetik“ der Fluoreszenzinduktionskurve:

Nach einer 45 minütlichen Dunkeladaptation der Blätter wurde die “schnelle Kinetik“ der Fluoreszenzinduktionskurve gemessen. Die erhaltene Kurve wurde als Grafik gespeichert, aus der später die A<sub>max</sub>-Werte ermittelt wurden.

Bestimmung der **Fv/Fm- “Yield“- und Rfd-Werte** der “langsamen Kinetik“ der Fluoreszenzinduktionskurve:

Um Fo wieder auf sein Ausgangsniveau zurückzuführen, wurde im Anschluß an die Messung der “schnellen Kinetik“ mit Infrarotlicht bestrahlt.

Der Wert für Fm und das Verhältnis Fv/Fm wurde vom PAM-2000 nach Einschalten des aktinischen Lichtes und Applikation eines sättigenden Lichtpulses automatisch bestimmt. Der Wert “Yield“ wurde nach ca. 15 minütlicher Bestrahlung mit aktinischem Licht im “steady state“ (der Ft-Wert bleibt konstant) mit weiteren sättigenden Lichtpulsen im 60 Sekunden-Abstand aufgenommen. Der entsprechende Zahlenwert für “Yield“ wurde dann automatisch von der Software des Meßgerätes nach oben angegebener Formel (1) berechnet.

Die Berechnung des Rfd-Wertes erfolgte nach der Messung manuell mit der ebenfalls oben genannten Formel (2).



## 2.4 Chlorophyllbestimmung/Frischgewichtbestimmung

### *Chlorophyllbestimmung*

Zur Chlorophyllbestimmung der Blätter von *Nicotiana tabacum* wurden 0,125 g (Frischmasse) eines Blattes (bzw. das gesamte Blatt, wenn es eine geringere Masse aufwies) mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert und in 0,5 mL Aceton (100 % V/V, 4 °C) aufgenommen. Die so vorbereiteten Proben wurden 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln im Ultraschallbad in einem geschlossenen Gefäß inkubiert. Der Chlorophyll-Aceton-Extrakt wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und das benutzte Gefäß mit 4,5 mL Aceton (80 % V/V, 4 °C) ausgespült. Nach einer Zentrifugation (10 min 2000 • g bei 4 °C) wurde der Rückstand zweimal mit jeweils 2,5 mL Aceton (80 % V/V, 4 °C) nachextrahiert (je 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln und anschließender Zentrifugation). Von den vereinigten Überständen erfolgte eine Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehaltes nach ARNON (1949) durch photometrische Messung der Extinktion bei 652 nm.

### *Frischgewichtbestimmung*

Die *Nicotiana tabacum*-Pflanzen wurden in Wurzeln, Sproß und Blätter unterteilt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Frischgewichtes auf einer Oberschalenwaage.

Eventuell vorhandene Samenanlagen oder Blüten wurden nicht gewogen, da diese bei einigen Pflanzen bereits abgefallen waren, bei anderen jedoch noch nicht.

## 2.5 Chemische Elementanalysen

Die Elementanalyse der Eluate wurde mit dem IMAGE-System, einer ICP-OES-Meßtechnik zur Aufnahme von vollständigen Emissionsspektren im Wellenlängenbereich von 160 bis 177 nm durchgeführt. Das Meßprogramm wurde auf die Elemente Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sn, Ti, V und Zn beschränkt.

Für die Messungen wurde ein JY 70 Plus der Firma ISA JOBIN YVON mit einem Cross-flow-Zerstäuber (Salzverträglichkeit ca. 30.000 bis 50.000 mg/L) eingesetzt. Der Zerstäubergasdruck betrug 2,6 bis 3,1 • 10<sup>5</sup> Pa. Die Gasflüsse betrugen: Plasma-Gas: 14 L/min, Zerstäuber-Gas: 1,5 bis 2 L/min, Coating-Gas: 0,2 L/min,

Carrier-Gas: 0,4 L/min. Als Gas wurde Argon mit der Qualität 4.6 der Firma LINDE eingesetzt.

Neben den Eluaten wurden auch Analysen zu den Elementgehalten von *Nicotiana tabacum*-Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden hierzu in ihre einzelnen Organe (Wurzeln, Sproß, Blätter und Blüten) getrennt. Die Wurzeln wurden danach viermal mit je 75 mL Wasser abgespült, um die an der Oberfläche adsorbierten Schwermetalle oder andere Elemente möglichst quantitativ zu entfernen. Nach Trocknung der Pflanzen bei 105 °C wurden die Pflanzenteile gemörsert. Vor einer Analyse mußten die Pflanzenproben aufgeschlossen werden. Der Aufschluß von 1 g getrocknetem Pflanzenmaterial erfolgte mit 14 mL HNO<sub>3</sub> (65 %ig) und 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %ig) 48 h lang in Aufschlußgefäßen nach DIN 38 414 Teil 7 (DEV S7). Nach Auffüllung der Proben auf 50 mL erfolgte die Bestimmung der Elementkonzentration mittels ICP-OES wie oben beschrieben.

## 2.6 Elektronenmikroskopie und EDX-Analysen

Die Wurzelspitzen von *Nicotiana tabacum* wurden von Pflanzen präpariert, direkt nachdem sie dem jeweiligen Hydrokulturmedium entnommen worden waren. Die Wurzeln wurden in die Öffnung eines Objektträger aus Kupfer eingebracht und in flüssigem Stickstoff gefroren. Danach wurden die gefrorenen Wurzeln unter Vakuum mit einem durch flüssigen Stickstoff gekühltem Messer quer gebrochen. Die Wurzeln wurden ca. 7 mm hinter der Wurzelspitze geschnitten. Die Wurzeln wurden danach in ein Raster-Elektronenmikroskop (ETEC-Autoscan) mit einem Röntgen-Detektor (KEVEX) und einem Vielkanalanalysator (NORAN, TN 5402) eingeführt. Das Vakuum ( $\sim 2\text{--}3 \cdot 10^{-3}$  Pa) wurde durch ein Öl-Diffusions-Pumpensystem erzeugt.

Während der Messung der Röntgenimpulsausbeute wurden folgende Parameter eingehalten: Beschleunigungsspannung für den Elektronenstrahl (10 kV), Strahlstrom (175 µA), Strom durch die Kondensorlinse (0,90 A), Meßfläche (8 µm<sup>2</sup>), am Detektor angelegte Vorspannung (500 V) und net time (15 s, exklusiv dead time).

Die Quantifizierung der ermittelten Elementgehalte erfolgte über ihr Peak/Background-Verhältnis.

### **3 Ergebnisse**

In dieser Arbeit werden Aussagen zur Leistungsfähigkeit und Grenzen von Phytotoxizitätstests getroffen. Da diese unter anderem auch von den Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen abhängig sind, wurden aus der großen Gruppe der möglichen Testlösungen beispielhaft die UTD-relevanten Abfalleluate ausgewählt.

Als erstes erfolgte eine Auswahl von Testmethoden, die potentiell zur Bewertung dieser Stoffgruppe geeignet erschienen. Einige dieser Standardmethoden mußten noch an die gegebenen Bedingungen angepaßt werden.

Nach diesen Vorarbeiten wurde die Wirkung der Abfalleluate auf die Testorganismen geprüft.

Auf Basis der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde eine Beurteilung der Eignung der Methoden zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten vorgenommen.

Im Anschluß wurden die möglichen Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Testorganismen untersucht. Diese waren in den vielfältigen Wirkungen der Eluate begründet, die durch die spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Organismen nicht einheitlich erfaßt wurden. Aus diesem Grund wurden die möglichen Effekte von UTD-relevanten Abfalleluaten auf ein geeignetes Modellsystem (Tabakpflanzen) analysiert. Nach Überprüfung der prinzipiellen Eignung des Systems wurden mit dem Ziel, die verschiedenen Wirkmechanismen von komplexen Abfalleluaten auf pflanzliche Organismen zu ergründen, vielfältige pflanzenphysiologische Untersuchungen am Tabak durchgeführt. Diese reichten von der Ermittlung des Chlorophyllgehaltes und der in die Pflanze aufgenommenen Elemente bis zur Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz und Analyse der Wurzelfunktion.

Diese Experimente hatten auch zum Ziel, die Leistungsfähigkeit der Messung der Chlorophyllfluoreszenz als neuen Phytotoxizitätstest zur Bewertung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten zu untersuchen.

### 3.1 Auswahl und Anpassung der Tests

#### 3.1.1 Auswahl

Um die Wirkungen von Abfalleluaten mit sehr komplexer Zusammensetzung an einem möglichst einfachen System zu untersuchen, wurden die Tests zunächst an einzelligen Grünalgen durchgeführt. Hier wurde ein Test basierend auf der Hemmung der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* ausgewählt, da *Chlamydomonas reinhardtii* einen pflanzenphysiologisch gut untersuchten Organismus darstellt und die Photosynthese sich besonders gut als Basis für einen Phytotoxizitätstest eignet. Sie ist eine relativ ursprüngliche Reaktion, die fast im gesamten Pflanzenreich in sehr ähnlicher Weise vertreten ist. Die Photosynthese nimmt im Metabolismus der einzelnen Organismen eine zentrale Position ein und liefert für viele andere Prozesse, wie z.B. das Wachstum, eine wesentliche Grundlage. Weiterhin lagen erste Hinweise dazu vor, daß sich die Messung der Photosyntheserate von *Chlamydomonas* zur Bewertung von salinaren Testlösungen eignet (WUNDRAM 1995).

Neben der Photosynthese von *Chlamydomonas* wurde noch ein biochemischer Parameter des allgemeinen Metabolismus untersucht. Dafür wurde der Fluoresceindiacetattest mit *Chlamydomonas* eingesetzt. Dieser Test basiert auf der enzymatischen Hydrolyse eines zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffes (Fluoresceindiacetat, FDA) zum fluoreszierenden Fluorescein und Essigsäure, eine Reaktion, die u.a. von der Aktivität der zelleigenen Esterasen und dem Transport des zugesetzten FDA in die Zellen anhängig ist. Diese Methode wurde bereits vielfach als Basis für Ökotoxizitätstests bei anderen Algen angewendet (BENTLEY-MOWAT 1982; DORSEY et al. 1989; GILBERT et al. 1992), mußte jedoch noch an den neuen Testorganismus *Chlamydomonas* und an die Untersuchung von UTD-relevanten Abfalleluaten zum FDA-Test mit *Chlamydomonas* angepaßt werden.

*Chlamydomonas* ist eine einzellige Alge, somit existieren hier keine unterschiedlichen Gewebe, auf die sich eine Schädigung auswirken kann, auch der Einfluß des Langstreckentransports ist bei den Algenzellen aufgrund ihrer geringen Größe vernachlässigbar. Bei höheren Landpflanzen existieren jedoch ausgeprägte Zelldifferenzierungen, durch welche den Zellen wiederum verschiedene Aufgaben und Funktionen zukommen. Die Aufnahme der Nährstoffe aber auch toxischer Stoffe durch eine Pflanze wird von speziell hierfür optimierten Zellen durchgeführt. Nach

der Aufnahme erfolgt ein Transport der Stoffe zunächst radiär und anschließend axial durch die Wurzel. Es folgt der Langstreckentransport durch den Sproß bis in die Blätter, die ihrerseits aus unterschiedlichen Geweben aufgebaut sind. Die Schädigung durch einen aufgenommenen toxischen Stoff kann sich auf allen Ebenen des beschriebenen Weges ereignen.

Aus diesem Grund war es zur Erfassung aller möglichen Wirkungen eines Eluates unerlässlich, neben Tests mit einzelligen Grünalgen, mit denen Beeinträchtigungen des Langstreckentransportes oder der Wurzelfunktion nicht erfaßt werden können, zusätzlich Testsysteme mit höheren Pflanzen einzusetzen. Die Auswahl geeigneter Phytotoxizitätstests erfolgte unter Berücksichtigung der in dem GSF-Bericht 40/93 (STEINBERG et al. 1993) aufgeführten Methoden. Von den hier aufgeführten Tests wurden die von vornherein ungeeigneten, z.B. weil nur Luftschadstoffe mit ihnen detektiert werden können, verworfen. Nach dieser Vorauswahl blieben daher: der Blattwachstumstest mit *Lemna minor*, der Wurzellängentest mit *Lepidium sativum*, ein Wachstumshemmtest mit Landpflanzen. Die Tests mit *Lemna* und *Lepidium* sind zwar für komplex zusammengesetzte Schadstofflösungen geeignet, wegen der hohen Salzgehalte der salinen UTD-relevanten Abfalleluate könnte die Aussagekraft dieser Tests jedoch eingeschränkt sein. Dieser Sachverhalt wurde, wie in Kapitel 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben, untersucht.

Zusätzlich wurden noch die Auswirkungen von Schadstoffen auf Zellsuspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* als Modell für "einzellige höhere Pflanzen" untersucht.

Diese Auswahl führte zu folgenden bereits oben genannten Tests:

1. *Chlamydomonas*-Photosynthesetest
2. FDA-Test mit *Chlamydomonas*
3. Blattwachstumstest mit *Lemna minor*
4. Wurzellängentest mit *Lepidium sativum*
5. Wachstumshemmtest mit verschiedenen Landpflanzen (Terrestrischer Pflanzenwachstumstest)
6. Wachstumshemmtest mit einer Zellkultur von *Nicotiana tabacum*

### 3.1.2 Anpassung und Optimierung einzelner Testverfahren

Die Tests mit *Lepidium* und *Lemna* und der Wachstumshemmtest mit Landpflanzen stellen Standardtestverfahren dar und mußten nicht an spezielle Testbedingungen adaptiert werden.

Der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (WUNDRAM 1995) für die vorliegenden Testbedingungen optimiert.

#### 3.1.2.1 Anpassung und Optimierung des *Chlamydomonas*-FDA-Tests

Um den FDA-Test reproduzierbar mit *Chlamydomonas* durchführen zu können und Fehlinterpretationen durch falsche Versuchsbedingungen auszuschließen, mußten folgende Fragen in der angegebenen Reihenfolge experimentell beantwortet werden:

1. Bei welchen Wellenlängen (Anregung und Emission) ist die Fluoreszenz von Fluorescein mit dem Hitachi F-3000 Spektralfluoreszenzphotometer optimal detektierbar?
2. Welchen Einfluß hat der pH-Wert auf das Testergebnis?
3. Welche Zellzahl ist am besten geeignet?
4. Welche Konzentration der FDA-Lösung ist optimal?
5. Welches ist die optimale Dauer der Inkubation mit der FDA-Lösung?
6. Wie lange muß eine Inkubation mit den toxischen Testlösungen stattfinden?

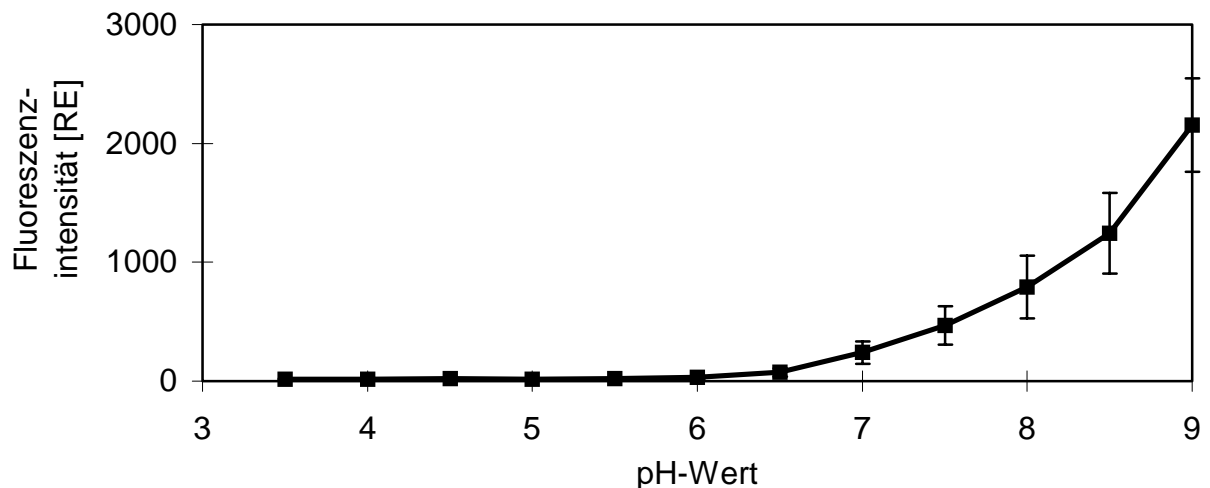
##### *Zu 1: Wellenlänge*

Bei einer Vermessung einer 0,005 %igen (50 µL einer 0,2 %igen Lösung in 2 mL Wasser) Fluorescein-Lösung in Leitungswasser war die Anregungswellenlänge von 490 nm und die Emissionswellenlänge von 520 nm optimal.

##### *Zu 2: pH-Wert*

Bei Ökotoxizitätstests mit anderen Algen auf der Basis der FDA-Spaltung wurde der pH-Wert nicht adäquat berücksichtigt. Der pH-Wert der Suspensionslösung konnte in vielfältiger Weise einen Einfluß auf den gesamten Metabolismus der Algen ausüben. Hinzu kam, daß ein pH-Wert abhängiger Zerfall von FDA nicht ausgeschlossen werden konnte. Um die Ergebnisse des FDA-Tests mit *Chlamydomonas* mit denen der Photosynthesetests vergleichen zu können, mußte daher in beiden Tests beim gleichen pH-Wert gearbeitet werden. Dieser wurde beim Photosynthesetest bereits mit 6,1 ermittelt.

Um den Einfluß des pH-Wertes auf den Zerfall des FDA zu untersuchen, wurden jeweils 50 µL einer FDA-Lösung in Aceton (0,2 % w/v) zu 1,5 mL eines  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /Citrat-Puffers (0,2/0,1 M) mit pH-Werten von 3,5 bis 9 gegeben und 1,5 Stunden inkubiert (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Zerfall von FDA bei einer Inkubation in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /Citrat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten.**

50 µL einer FDA-Lösung in Aceton (0,2 % w/v) wurden jeweils zu 1,5 mL eines  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /Citrat-Puffers (0,2/0,1 M) gegeben und 1,5 Stunden inkubiert ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

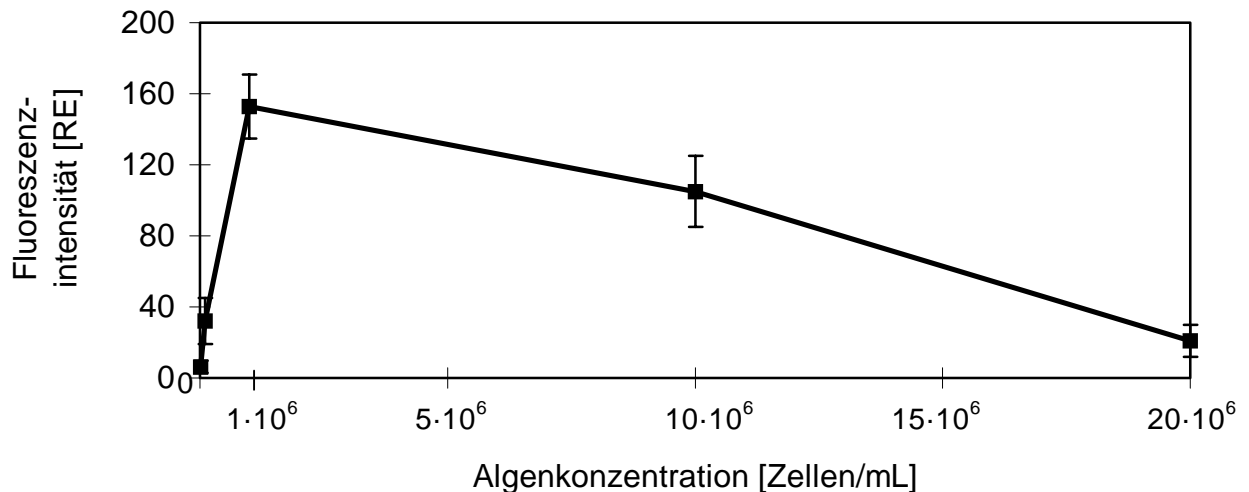
Das Ergebnis zeigt, daß ein pH-abhängiger Zerfall von FDA existierte, dieser jedoch bis zu einem pH-Wert von 6,5 sehr gering war. Daher eignete sich der angestrebte pH-Wert von 6,1 sehr gut sowohl für den Photosynthesetest als auch für den FDA Test mit *Chlamydomonas*. Der bei pH 6,1 auftretende geringe Zerfall wurde bei den entsprechenden Ökotoxizitätstests berücksichtigt.

### Zu 3: Zellzahl

Um ein möglichst empfindliches Testsystem zu erhalten, wurde die Zellzahl so gewählt, daß eine möglichst hohe Fluoreszenzintensität erreicht wurde. Auf diese Weise war auch eine geringe Störung der Algen und der daraus resultierende Rückgang der Fluoreszenzintensität detektierbar. Ab einer gewissen Algenkonzentration "beschatteten" sich die Algen jedoch sehr stark gegenseitig und es trat ein hohes Quenching der Fluoreszenz ein.

Aus diesem Grund mußte die optimale Algenzahl ermittelt werden, bei der genügend Algen als Träger der notwendigen Enzyme vorhanden waren, sie sich jedoch noch

nicht zu stark beschatteten. Hierzu wurde eine Algensuspension ( $2 \times 10^7$  Zellen/mL) mit einer großen Menge FDA versetzt (zu 32 mL Algensuspension 4 mL FDA-Lösung in Aceton (0,2 % w/v)), so daß die FDA-Konzentration nicht limitierend war. Nach 2 h Inkubation und Trennung der Algen vom Medium wurden unterschiedliche Konzentrationen der Algensuspension mit PIPES-Puffer (pH 6,1) hergestellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität dieser Algensuspensionen bestimmt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Variation der Fluoreszenzintensität mit steigender Algenkonzentration.**

32 mL einer Algensuspension ( $2 \times 10^7$  Zellen/mL) wurden mit 4 mL FDA-Lösung in Aceton (0,2 % w/v) versetzt. Nach 2 h Inkubation und Trennung der Algen vom Medium wurden unterschiedliche Konzentration der Algensuspension mit PIPES-Puffer (pH 6,1) hergestellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität dieser Algensuspensionen bestimmt ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

Bei geringer Algenkonzentration war die gemessene Fluoreszenzintensität sehr niedrig, da die Suspension nur wenig fluoreszierende Algen enthielt. Bei einer Algenkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL wurde die höchste Fluoreszenzintensität erreicht, bevor diese durch zu starke gegenseitige Beschattung der Algen und Quenchingvorgänge wieder stark absank.

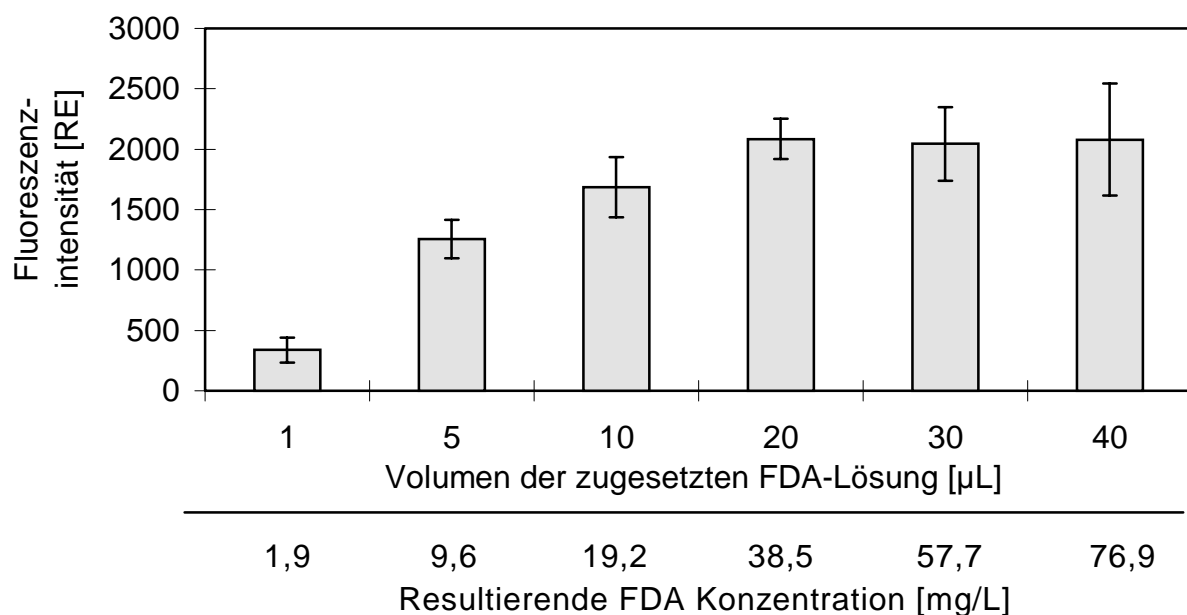
Daher wurden alle weiteren Tests mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL durchgeführt.

#### *Zu 4: Konzentration von FDA*

Die Konzentration von FDA als Substrat für die Esterasen durfte im Testansatz nicht limitierend sein. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit mußte FDA in Aceton



zugesezt werden, das in hohen Konzentrationen Schäden an den Algen hervorrief. Somit bedingte die Erhöhung der FDA-Konzentration im Testansatz zugleich einen Anstieg der Acetonkonzentration. Es mußte daher eine FDA-Konzentration zugesezt werden, die ausreichend viel FDA lieferte, aber die Acetonkonzentration in der Suspension nicht zu hoch ansteigen ließ. Um diese optimale Menge an zugesezter FDA-Stammlösung zu ermitteln, wurde je 1 mL einer Algensuspension zwei Stunden lang mit verschiedenen Volumina einer FDA-Lösung (0,2 % w/v) inkubiert (Abbildung 4). Das Endvolumen wurde auf ein einheitliches Volumen von 1,04 mL mit PIPES-Puffer (pH 6,1) eingestellt.



**Abbildung 4: Fluoreszenzintensität nach zweistündiger Inkubation von *Chlamydomonas* mit unterschiedlich hohen FDA-Zusätzen.**

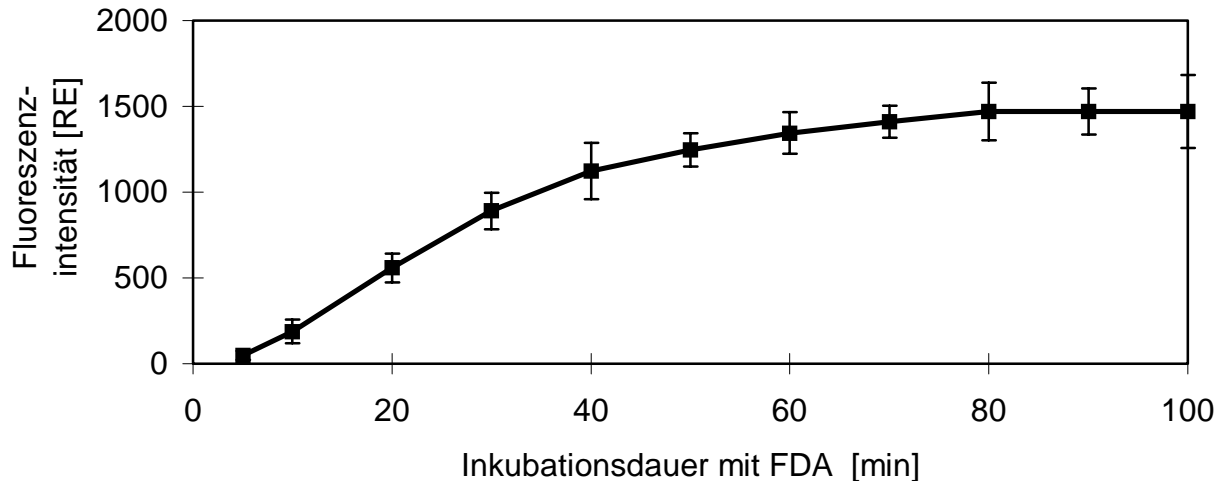
Je 1 mL der Algensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurde mit verschiedenen Volumina einer FDA-Lösung (0,2 % w/v) inkubiert. Das Endvolumen wurde auf ein einheitliches Volumen von 1,04 mL mit PIPES-Puffer (pH 6,1) eingestellt. Nach zwei Stunden wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

Mit erhöhter Zugabe der FDA Lösung stieg die Fluoreszenzintensität an. Eine Zugabe von mehr als 20 µL FDA Lösung führte zu keiner weiteren Steigerung. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche mit einem Zusatz von 20 µL FDA Lösung pro 1 mL Algensuspension durchgeführt.

#### *Zu 5: Dauer der Inkubation mit der FDA-Lösung*

Die Dauer der Inkubation mit FDA wurde so gewählt, daß keine weitere Fluoreszenzintensitätszunahme mehr durch neu gebildetes Fluorescein eintrat. Um

diesen Zeitpunkt zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzintensität eines nach der bisher ermittelten Methode hergestellten Ansatzes über einen Zeitraum von 100 Minuten mit FDA gemessen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Fluoreszenzintensität der Algensuspension in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit FDA.**

Je 1 mL einer Algensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurde 20  $\mu$ L FDA-Lösung (0,2 % w/v) inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer bestimmt ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

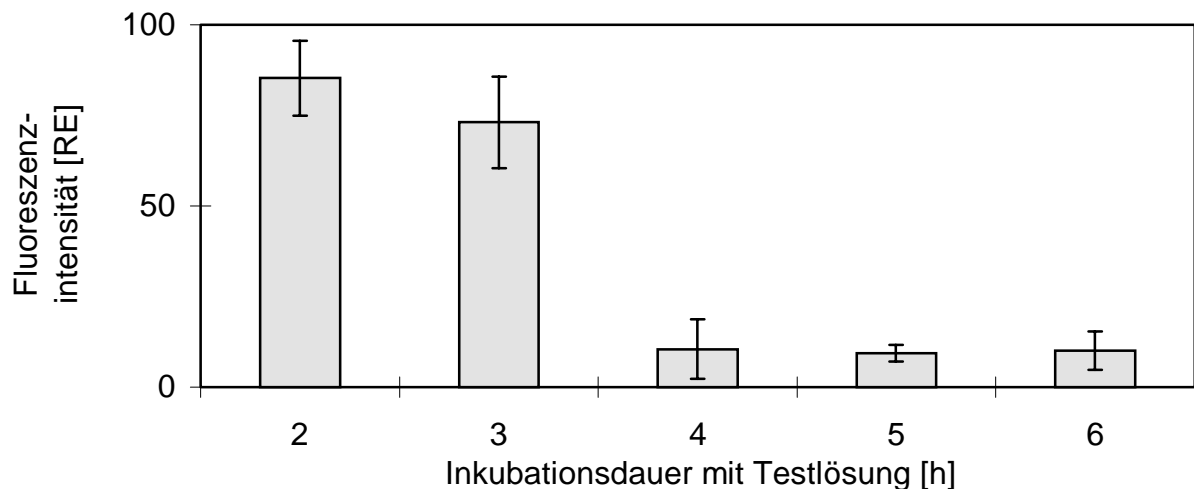
Nach Zugabe des FDA erfolgte ein rascher Anstieg der Fluoreszenzintensität durch gebildetes Fluorescein. Nach 30 minütiger Inkubation verlangsamte sich die Zunahme der gemessenen Intensität, bis sie schließlich nach 80 Minuten konstant blieb.

Da keine Aussage über die Reaktionskinetik getroffen werden sollte, erfolgte die Messung in den weiteren Versuchen nach 90 minütiger Inkubation mit FDA. So konnte ausgeschlossen werden, daß sich Unterschiede in den erzielten Meßwerten bedingt durch unterschiedlich lange Inkubationsdauer ergaben.

#### *Zu 6: Dauer der Inkubation mit den toxischen Testlösungen*

Um die Ergebnisse des *Chlamydomonas*-FDA-Tests mit denen des *Chlamydomonas*-Photosynthesetests vergleichen zu können, mußte nicht nur der pH-Wert in beiden Testverfahren gleich sein, sondern auch die Inkubationsdauer der Algen in der Testlösungen. Beim *Chlamydomonas*-Photosynthesetest betrug diese Zeit 4 Stunden. Ob diese Inkubationsdauer auch für den *Chlamydomonas*-FDA-Tests geeignet war, wurde durch Inkubation der Algen mit einer willkürlich

ausgewählten Testlösung (150-IP21, Konzentration: 30 mL/L) ermittelt, indem Ansätze jeweils zwei bis zu sechs Stunden inkubiert wurden (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Einfluß der Inkubationsdauer von *Chlamydomonas* mit 150-IP21 (30 mL/L) auf die Hydrolyse von FDA.**

Die Algensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurde unterschiedlich lange mit der Testlösung 150-IP21 (30 mL/L) inkubiert. Jeweils 90 Minuten vor der Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm) wurden die Ansätze mit 20  $\mu\text{L}$  FDA-Lösung (0,2 % w/v) versetzt. (Für den Ansatz mit einer Inkubationsdauer von 2 Stunden bedeutet dies z.B.: Die Zugabe der FDA-Lösung erfolgte 30 Minuten nach Zusatz der Testlösung 150-IP21.) Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

In den ersten 3 Stunden der Inkubation mit der Testlösung erfolgte eine kontinuierliche jedoch sehr geringe Schädigung der Algen. Nach einer 4 stündigen Inkubation mit 150-IP21 waren die Algen stark geschädigt. Die Stärke dieses Effektes nahm auch bei längerer Inkubation nicht weiter zu. Daher war eine Inkubationsdauer der Algen mit den Testlösungen von 4 Stunden auch für den *Chlamydomonas*-FDA-Test geeignet und wurde in den weiteren Tests verwendet.

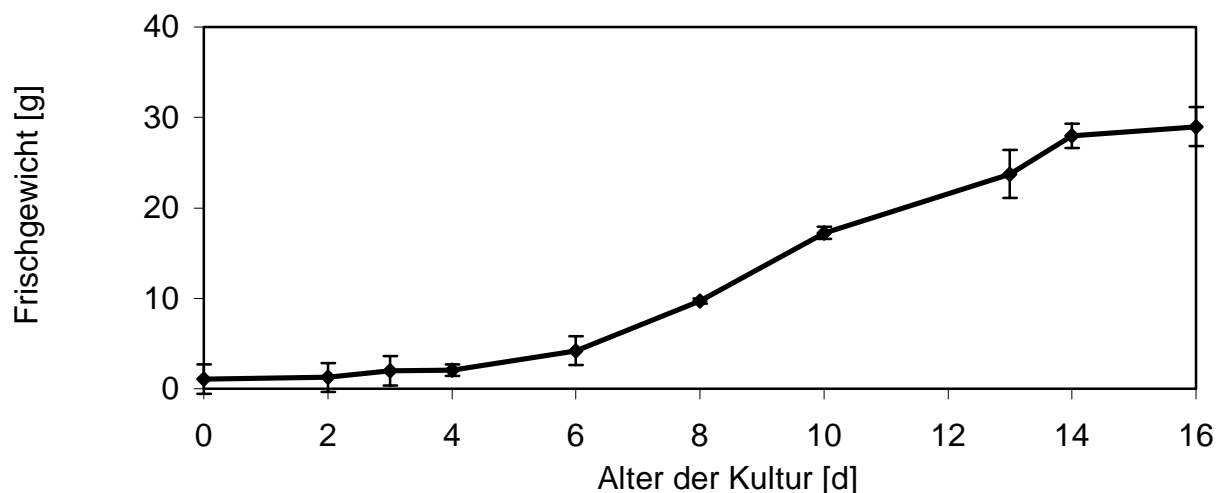
Alle folgenden Versuche mit dem *Chlamydomonas*-FDA-Test wurden nach der oben beschriebenen Weise durchgeführt, so wie auch in Kapitel 2.3.2 dargestellt. Das Ergebnis der Versuche wird als Fluoreszenzintensität in % der Kontrolle angegeben. Eine durch die toxische Testlösung verursachte Reduzierung der Fluoreszenzintensität von 1000 relativen Einheiten (Kontrolle) auf 800 wird als 80 % der Kontrolle festgehalten.

### 3.1.2.2 Anpassung und Optimierung des Wachstumshemmtests mit einer Zellkultur von *Nicotiana tabacum*

Bei Einsatz der Zellkultur für den Ökotoxizitätstest war es wichtig, stets Zellen aus der gleichen Entwicklungsphase zu verwenden, um somit Zellen mit identischem physiologischem Charakter zu benutzen. Nur so konnte garantiert werden, daß der festgestellte Effekt allein auf der Wirkung der Testlösung beruhte und nicht auch auf einen Unterschied im physiologischen Zustand der Zellen.

Die Zellen befanden sich zu Beginn eines Versuches immer im logarithmischen Wachstumsstadium. Der Test begann mit der Subkultivierung einer genau definierten Zellmasse in einem Medium mit Testlösung und endete nach einem Wachstumszyklus noch vor Beginn der stationären Phase.

Aus diesem Grund mußte das Wachstumsverhalten der Zellkultur genau bekannt sein, so daß das Frischgewicht im Laufe eines Wachstumszyklus ermittelt wurde. Die Zellen zur Bestimmung der Wachstumskurve wurden mit dem gleichen Verhältnis Zellmasse zu Volumen des Mediums (0,75 g Frischgewicht auf 70 mL Medium) subkultiviert wie in den späteren Ökotoxizitätstests vorgesehen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Wachstum der *Nicotiana*-Zellkultur.**

Die Wachstumskurve wurde durch Subkultivierung von 0,75 g Zellmasse (Frischgewicht) auf 70 mL MS-Medium (Kapitel 2.1.5) auf einem Rotationsschüttler (120 U/min) bei 26 °C im Dunkeln erstellt. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

Nach einer 4 tägigen Lag-Phase folgte die logarithmische Wachstumsphase bis zum 14. Kulturtag, bevor die stationäre Phase einsetzte.

Nach diesem Ergebnis wurden die Ökotoxizitätstests mit der Subkultivierung einer 14 Tage alten Kultur gestartet. Die Inkubation mit den Testlösungen erfolgte wiederum bis zum 14. Tag.

### **3.2 Ergebnisse der Tests mit Salzlaugen und Abfalleluaten**

Nach der Auswahl der Testmethoden und ihrer Anpassung an die Versuchsbedingungen wird in diesem Kapitel die Prüfung der Eignung der ausgewählten Testmethoden und -organismen zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten beschrieben.

Es wurde nacheinander die Wirkung der Eluate auf die unterschiedlichen Organismen untersucht. Somit konnte eine Aussage zur Leistungsfähigkeit der einzelnen Tests zur Beurteilung der Ökotoxizität der Eluate abgeleitet werden. Stießen die Phytotoxizitätstests an ihre Grenzen, d.h. waren sie nicht für die entsprechenden Eluate geeignet, wurde dies auch deutlich.

Weiterhin ließen die Ergebnisse der nachfolgend beschriebenen Versuche Vergleiche der Empfindlichkeiten der einzelnen Phytotoxizitätstests zu.

Schließlich konnte auf der Basis dieser Ergebnisse auch die Leistungsfähigkeit der Phytotoxizitätstest im Vergleich zur chemischen Elementanalyse beurteilt werden.

Nach welchem Kriterium entschieden werden kann, ob ein Test sich in diesem Zusammenhang als geeignet erweist, ergibt sich aus den Bestimmungen zur Deponierung der UTD-relevanten Abfälle und den daraus resultierenden Konsequenzen:

Derzeit wird gemäß TA Abfall die Einlagerung von besonders überwachungsbedürftigen Abfällen in vorhandenen offenen Hohlräumen vorgeschrieben. Dabei sind aufgelassene Salzbergwerke zu bevorzugen, eine Deponierung in anderen ehemalige Anlagen des nicht-salinen Gewinnungsbergbaus ist jedoch theoretisch nicht ausgeschlossen.

Somit waren für die ökotoxikologische Bewertung der Abfälle vor allem deren Eluate basierend auf den Salzlaugen IP9 und IP21 als Simulation eines "worst case" in Untertagedeponien in Salzstöcken relevant. Zusätzlich wurden dennoch Grundwasser-Eluate, wie sie in nicht salinen Untertagedeponien gebildet würden, hergestellt und ökotoxikologisch untersucht.

Durch die Verwendung von Salzlaugen als Elutionsmittel der Abfälle enthielten die resultierenden Eluate ebenfalls hohe Salzkonzentrationen. Salz hat auf alle Lebewesen bei höheren Konzentrationen eine schädigende Wirkung. Somit war zu erwarten, daß auch die für die beschriebenen Tests eingesetzten Organismen ab einer gewissen Salzkonzentration Schäden aufwiesen.

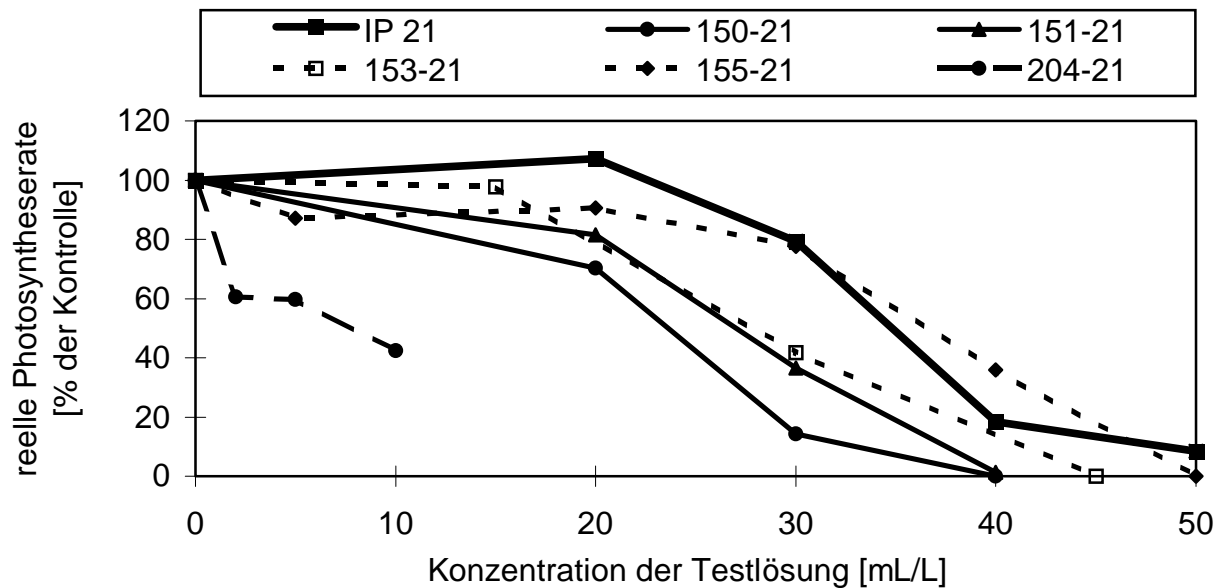
In den ökotoxikologischen Untersuchungen sollte jedoch nicht die Wirkung der Salze, sondern der aus den Abfällen eluierten Schwermetalle oder sonstigen Schadstoffe detektiert werden, da die Folgen eines "worst case" in Untertagedeponien beurteilt werden sollte. Aus diesem Grund war es bei allen Tests notwendig zu prüfen, ob und inwieweit der durch das Salz verursachte Effekt von der Toxizität der aus dem Abfall eluierten Substanzen unterschieden werden konnte. Nur so konnte mit dem eingesetzten Testverfahren eindeutig die Schädigung durch die Schwermetalle oder andere Substanzen erfaßt werden. Ermöglichte ein Test daher nicht die deutliche Unterscheidung zwischen der Wirkung des Salzes und der Schwermetalle, so war er nicht zur Bewertung der UTD-relevanten Abfalleluate geeignet.

### **3.2.1 *Chlamydomonas*-Photosynthesetest**

#### **3.2.1.1 Salzlaugeneluate**

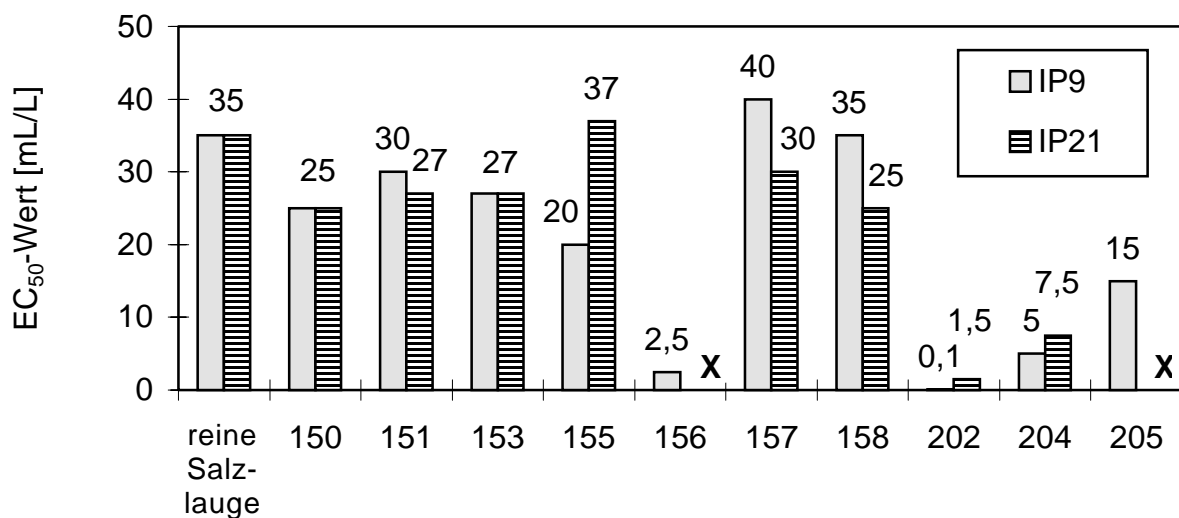
Um aus den oben beschriebenen Gründen die Einflüsse der reinen Salzlaugen IP9 und IP21 auf die Organismen zu überprüfen, wurden in den Tests mit *Chlamydomonas* und allen weiteren Tests neben den Eluaten auch die beiden Salzlösungen untersucht.

Die Ergebnisse des *Chlamydomonas*-Photosynthesetests sind für einige Salzlaugeneluate in Abbildung 8 als Dosis-Wirkungsbeziehungen dargestellt. Die hier nicht gezeigten Messungen sind dem Anhang (Abbildungen A1-A3) beigelegt. In Abbildung 9 sind jedoch die Effekte aller mit *Chlamydomonas* untersuchten Salzeluate und der reinen Salzlösungen als EC<sub>50</sub>-Werte dargestellt.



**Abbildung 8: Der *Chlamydomonas*-Test: Beeinträchtigungen der Photosynthese durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



**Abbildung 9: Hemmung der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* durch zwei verschiedene Salzlösungen und auf diesen basierende Abfalleluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als  $EC_{50}$ -Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der  $EC_{50}$ -Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der  $EC_{50}$ -Werte in mL/L angegeben.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

Die beiden reinen Salzlösungen IP9 und IP21 verursachten eine nahezu identische Hemmung der Photosyntheserate, obwohl sie sich in ihrer Zusammensetzung

deutlich unterschieden (Hauptbestandteil von IP9: NaCl, von IP21: MgCl<sub>2</sub>). Ihr Gesamtsalzgehalt war jedoch nahezu identisch.

Alle untersuchten Salzlaugeneluate zeigten eine hemmende Wirkung auf die Photosyntheserate von *Chlamydomonas*. Die meisten Abfalleluate wiesen, unabhängig davon, ob sie mit IP9 oder IP21 hergestellt wurden, eine ähnlich starke Hemmeigenschaft auf. Dabei übte die Art der Salzlösung, mit der die Abfallstoffe eluiert wurden, keinen deutlichen Einfluß auf ihr toxisches Potential gegenüber der Photosyntheserate von *Chlamydomonas* aus.

Der Vergleich der Toxizität zwischen schwermetallhaltiger und -freier Lösung zeigte, daß fast alle Salzlaugeneluate toxischer reagierten als die reinen Salzlösungen. Lediglich bei den Eluaten 155-IP21, 157-IP9 und 158-IP9 unterschieden sich die Hemmungen nicht von der korrespondierenden reinen Salzlauge. Dies wies darauf hin, daß diese Eluate keine starke Toxizität besaßen.

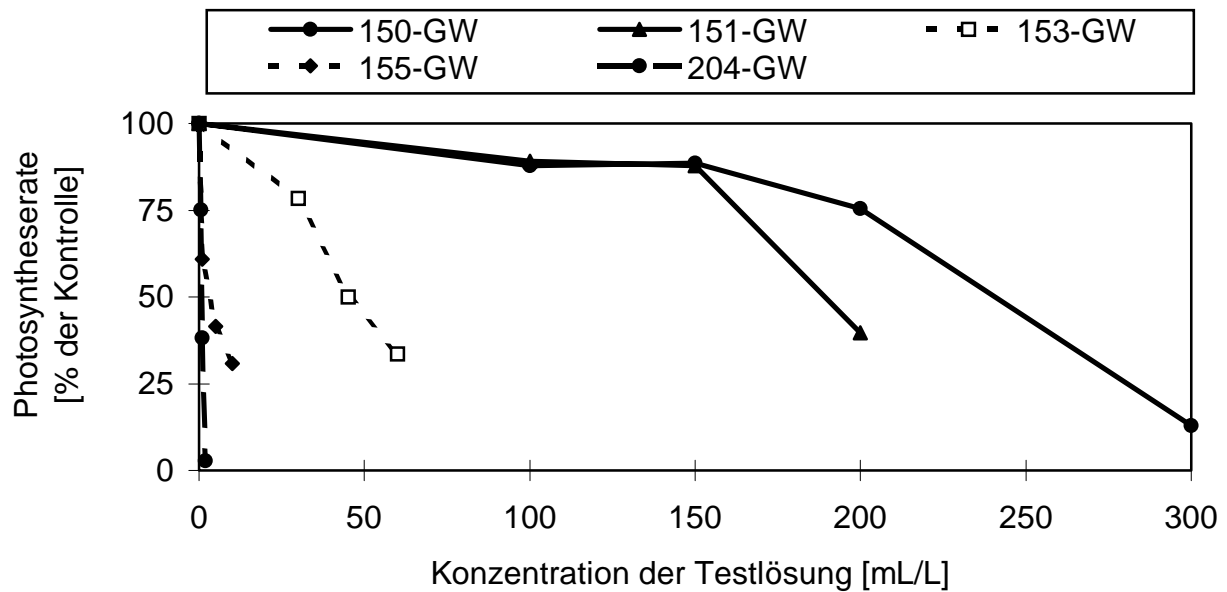
#### **3.2.1.2 Eignung des *Chlamydomonas*-Photosynthesetests zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluate**

Der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest stellt ein geeignetes Testverfahren zur Beurteilung des toxischen Potentials von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten dar. Er führte in kurzer Zeit zu Ergebnissen, die eine Beurteilung der Effekte der Schwermetalle und nicht nur der Salzmatrizes erlaubte.

#### **3.2.1.3 Grundwassereluate**

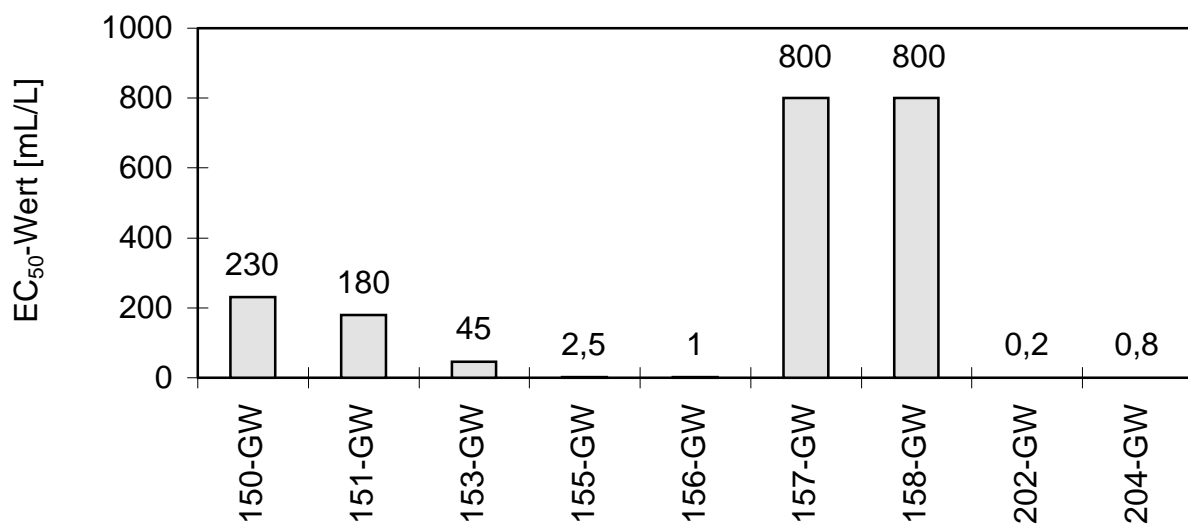
Die Wirkungen einiger ausgewählter Grundwassereluate auf die Photosyntheserate von *Chlamydomonas* sind in Abbildung 10 aufgeführt. Die Ergebnisse zu allen in dieser Abbildung nicht enthaltenen Grundwassereluate befinden sich im Anhang (Abbildung A4). In Abbildung 11 wird die Hemmung aller Grundwassereluate auf die Photosyntheserate von *Chlamydomonas* als EC<sub>50</sub>-Wert wiedergegeben. Eine Kontrolle mit reinem Grundwasser konnte nicht durchgeführt werden, da das Grundwasser nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Es konnte jedoch davon ausgegangen werden, daß von dem reinen Grundwasser keine oder nur eine sehr geringe hemmende Wirkung sowohl auf *Chlamydomonas* als auch auf *Lemna* und *Lepidium* ausging.





**Abbildung 10: Hemmung der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis von Grundwasser.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode.



**Abbildung 11: Wirkung verschiedener Grundwassereluate auf die Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

Alle Grundwassereluate reagierten toxisch oder hemmend auf die Photosyntheserate von *Chlamydomonas*, so daß für alle Grundwassereluate EC<sub>50</sub>-Werte ermittelt werden konnten. Die Stärke der Toxizität der verschiedenen Eluate unterschied sich aber deutlich voneinander. Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte erstreckten

sich über einen Bereich von 3 Zehnerpotenzen zwischen den Werten 0,2 mL/L (202-GW: E-Filterstaub aus Sonderabfallverbrennung) bis 800 mL/L (157- und 158-GW: Filterstaub aus Braun- und Steinkohlekraftwerk).

#### **3.2.1.4 Vergleich der Salzlaugeneluatate mit den Grundwassereluaten**

In den meisten Fällen unterschied sich die Toxizität des Grundwassereluates deutlich von derjenigen der Salzlaugeneluatate. Dabei reagierten bei den Abfallstoffen mit der CA.-Nummer 150, 151, 153, 157 und 158 die Salzlaugeneluatate stärker hemmend auf die Photosynthese als die jeweiligen Grundwassereluatate. Hierbei wurden  $EC_{50}$ -Werte für Salzlaugeneluatate erreicht, die bis zu dreißigfach niedriger waren als die der Grundwassereluatate ( $EC_{50}$ -Wert für 158-IP21: 25 mL/L, für 158-GW: 800 mL/L).

Von den Abfällen mit der CA.-Nummer 155, 156 und 204 reagierte jedoch das Grundwassereluat deutlich toxischer als das Salzlaugeneluat. Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte dieser Salzlaugeneluatate überstiegen diejenigen der korrespondierenden Grundwassereluatate um maximal das Zehnfache ( $EC_{50}$ -Wert für 204-IP21: 7,8 mL/L, für 204-GW: 0,8 mL/L).

Im Falle des Abfalles Nr. 202 unterschieden sich die Toxizitäten der Salzlaugeneluatate nicht signifikant von der des Grundwassereluates.

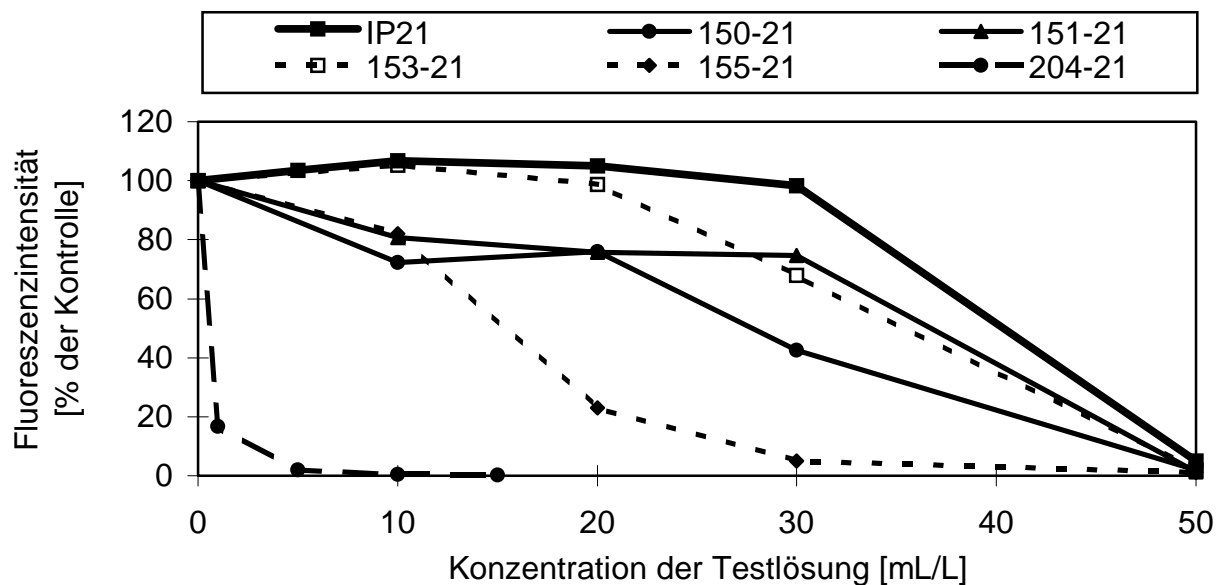
Der Vergleich der Wirkungen der Salzlaugeneluatate mit denen der Grundwassereluatate zeigte, daß verschiedene Elutionsmittel auch unterschiedlich toxische Eluate nach sich ziehen können. Im Falle einiger Substanzen führte die Elution mit Salzlaugen zu deutlich toxischeren Eluaten, wohingegen für andere eine Elution mit Grundwasser die Toxizität des resultierenden Eluates erhöhte. Das Elutionsmittel beeinflusste also die Toxizität.

### **3.2.2 *Chlamydomonas*-FDA-Test**

#### **3.2.2.1 Salzlaugeneluatate**

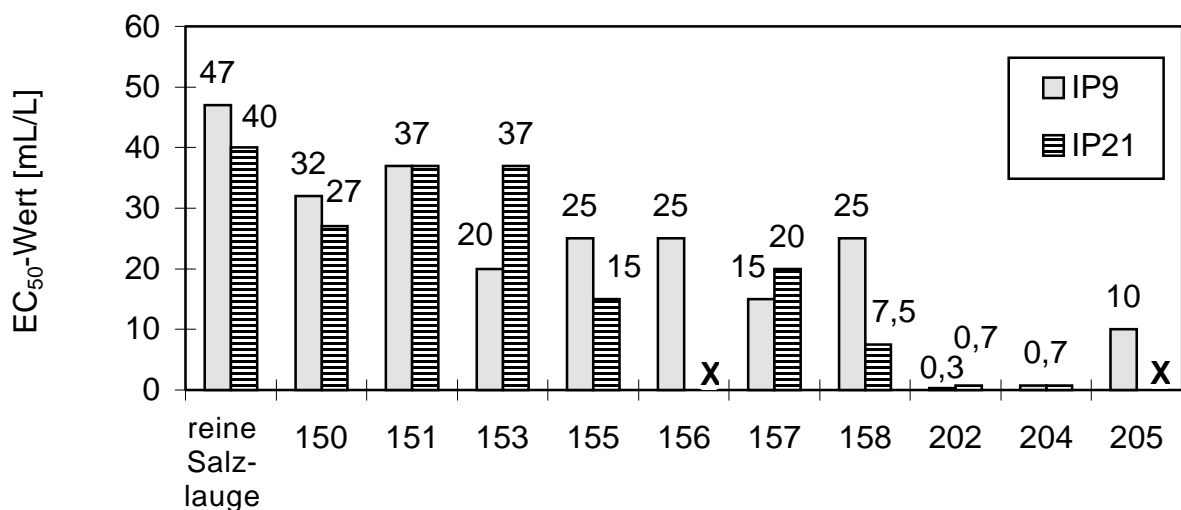
In Abbildung 12 sind die Effekte einiger ausgewählter Lösungen auf die FDA-Spaltung durch Esterasen von *Chlamydomonas* in ihrer Konzentrationsabhängigkeit angegeben. Diese Meßwerte zu den übrigen Salzlaugeneluaten und der Salzlauge IP9 werden im Anhang (Abbildungen A5-A7) dargestellt. Die Effekte aller mit dem

*Chlamydomonas*-FDA-Test untersuchten Salzeluate und Salzlösungen sind als  $EC_{50}$ -Werte in Abbildung 13 aufgeführt.



**Abbildung 12: Der FDA Test: Hemmung der FDA-Spaltung durch saline UTD-relevante Abfalleluat auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte auf Basis der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode. Dargestellt ist eine Auswahl der getesteten Eluate. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



**Abbildung 13: Wirkung zwei verschiedenen Salzlagen und auf diesen basierende Abfalleluat auf die FDA-Spaltung von *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als  $EC_{50}$ -Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der  $EC_{50}$ -Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der  $EC_{50}$ -Werte in mL/L angegeben.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

Auch die FDA Spaltung bei *Chlamydomonas* wurde von den untersuchten reinen Salzlösungen IP9 und IP21 nachweisbar gehemmt. Der  $EC_{50}$ -Wert dieses Effektes unterschied sich für beide Lösungen nur gering.

Diese schädliche Wirkung des Salzes setzte jedoch erst in einem so hohen Konzentrationsbereich ein, daß die Toxizitäten von nahezu allen Salzlaugeneluates stärker waren und somit die Wirkung der Schwermetalle und anderer Toxine erfaßt wurde.

Obwohl sich die beiden reinen Salzlösungen IP9 und IP21 in ihrer Hemmwirkung auf den FDA-Test kaum unterschieden, hatte die Wahl der Salzlösung bei der Elution einiger Abfälle große Auswirkungen auf die Toxizität des resultierenden Eluates. Die Elution der Abfälle Nummer 150, 155 und 158 mit der IP21-Lösung führte zur Bildung von Eluates, die toxischer waren als die gleichen mit der IP9-Lösung eluierten Proben. Bei den Abfällen Nummer 153, 157 und 202 war dies umgekehrt. Einige Abfalleluat wiesen jedoch unabhängig vom Elutionsmittel (IP9 oder IP21) die gleiche Hemmeigenschaft auf (151, 204). In diesen Fällen übte die Art der Salzlösung, mit der die Abfallstoffe eluiert wurden, keinen Einfluß auf ihr toxisches Potential aus.

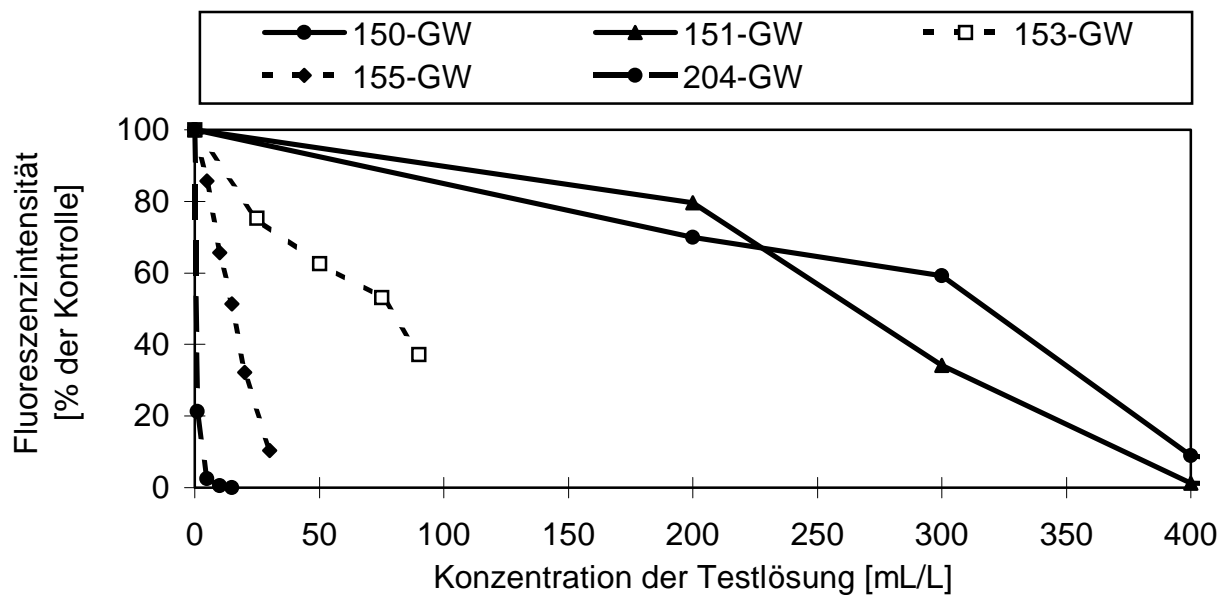
### **3.2.2.2 Eignung des *Chlamydomonas*-FDA-Tests zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluat**

Der *Chlamydomonas*-FDA-Test stellt wie bereits der Photosynthesetest ein geeignetes Testverfahren zur Beurteilung des toxischen Potentials von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten dar. Auch mit dieser Methode konnte die Wirkung der Schwermetalle eindeutig bestimmt werden.

### **3.2.2.3 Grundwassereluate**

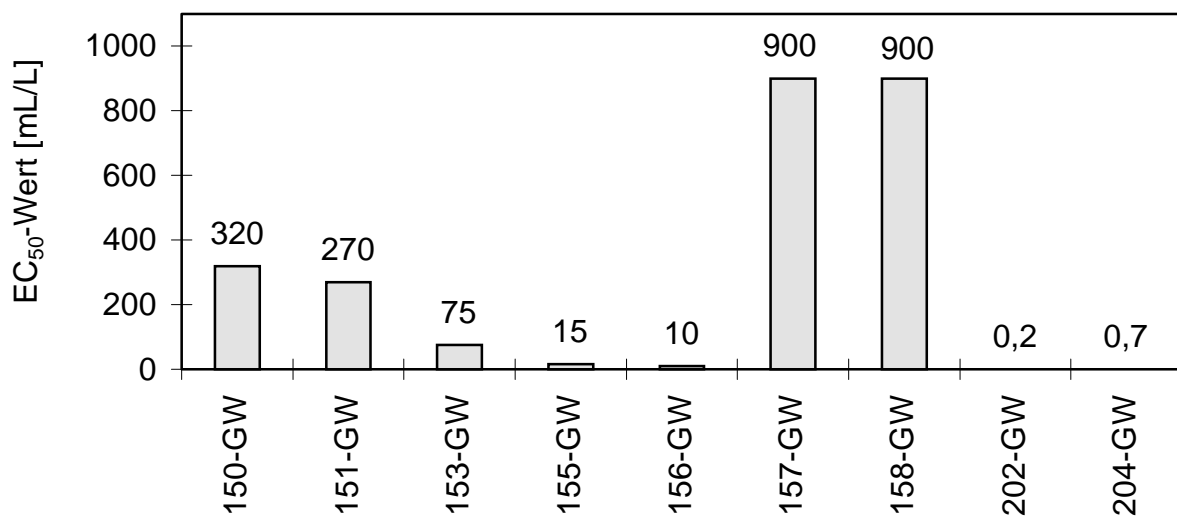
Auch die Grundwassereluate wurden mit dem *Chlamydomonas*-FDA-Test untersucht. Die Wirkung dieser Eluate auf die Fluoreszenzintensität des Testansatzes wird an einigen Beispielen in Abbildung 14 dargestellt. Die Effekte der in dieser Abbildung nicht aufgeführten Grundwassereluate sind im Anhang (Abbildung A8) wiedergegeben.

Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte werden jedoch für alle Grundwassereluate in Abbildung 15 gezeigt.



**Abbildung 14: Hemmung der FDA-Spaltung von *Chlamydomonas reinhardtii* durch verschiedene Grundwassereluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode.



**Abbildung 15: Wirkung verschiedener Grundwassereluate auf die FDA-Spaltung von *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Der Test wurde gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode durchgeführt. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

Sämtliche Grundwassereluate führten zwar zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität des Testansatzes, doch ergaben sich große Unterschiede in der Intensität dieser Hemmung. Während für die am geringsten toxischen Eluate 157- und 158-GW EC<sub>50</sub>-Werte von 900 mL/L gemessen wurden, verhielt sich das am stärksten

toxische Eluat (202-GW) gemessen am  $EC_{50}$ -Wert 4500 mal toxischer ( $EC_{50}$ -Wert: 0,2 mL/L). Die übrigen Grundwassereluate zeigten  $EC_{50}$ -Werte zwischen diesen Extrema.

### 3.2.2.4 Vergleich der Salzlaugeneluate mit den Grundwassereluates

Abfall Nr. 204 zeigte unabhängig davon, ob mit Grundwasser oder mit Salzlauge eluiert wurde, die gleiche Toxizität. Nur bei diesen Eluates hatte das verwendete Elutionsmittel daher keinen Einfluß auf die Toxizität der Probe. Bei allen weiteren Abfällen ergaben sich abhängig davon, ob mit einer Salzlauge oder Grundwasser eluiert wurde, Unterschiede in den  $EC_{50}$ -Werten. Die Grundwassereluate der Abfälle Nummer 150, 151, 153, 157 und 158 wiesen eine geringere Toxizität als die Salzlaugeneluate auf. Am auffälligsten war dieser Unterschied zwischen 158-IP21 und 158-GW. Der  $EC_{50}$ -Wert dieses Grundwassereluates war 120 mal höher als der des Salzlaugeneluates.

Lediglich bei zwei Abfällen (156, 202) wies das Grundwassereluat eine größere Toxizität auf, auch wenn die Unterschiede nur sehr gering waren.

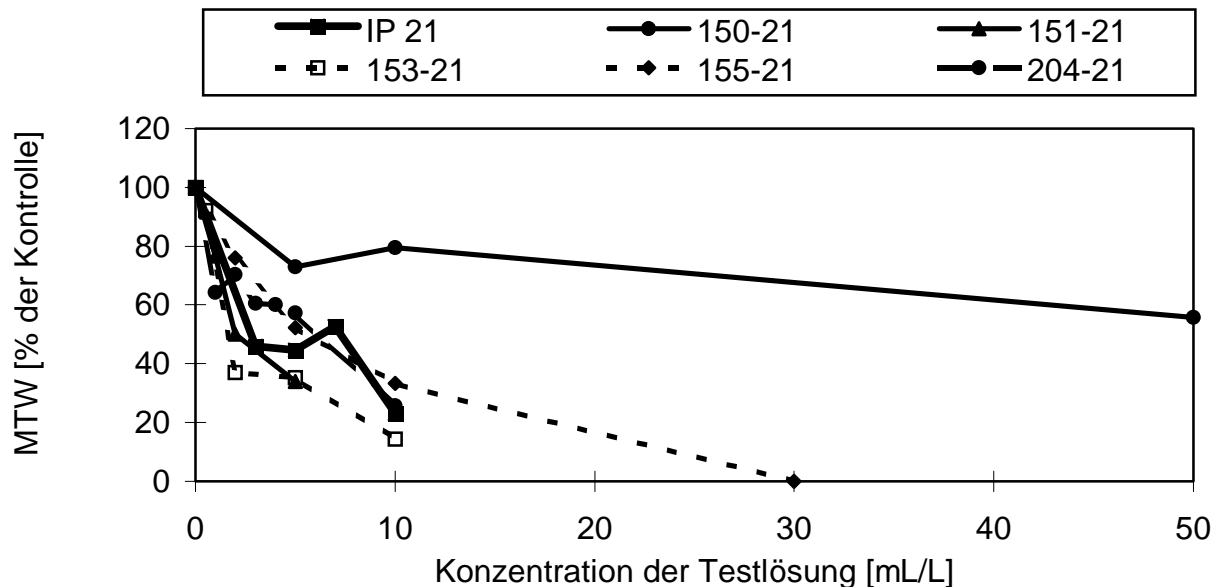
Im Falle des Abfalles Nr. 202 unterschieden sich die Toxizitäten der Salzlaugeneluate nicht signifikant von der des Grundwassereluates.

Die Toxizität von 155-GW ( $EC_{50}$ -Wert: 15 mL/L) war zwar größer als von 155-IP9 ( $EC_{50}$ -Wert: 25 mL/L), sie war jedoch mit der des zweiten Salzlaugeneluates 155-IP21 identisch ( $EC_{50}$ -Wert: 15 mL/L).

### 3.2.3 *Lemna*-Blattwachstumstest

#### 3.2.3.1 Salzlaugeneluate

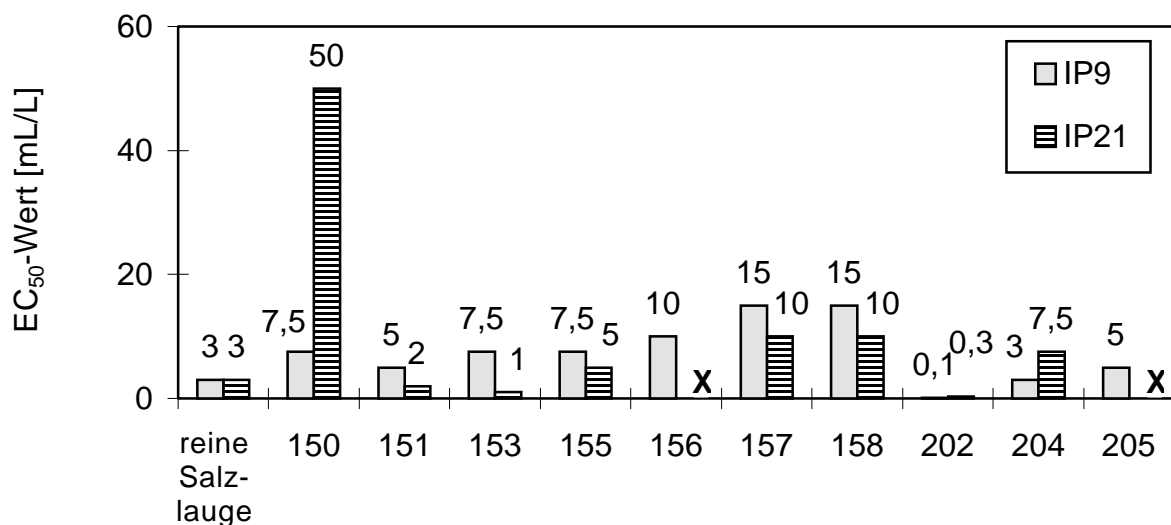
Die Wirkung der ausgewählten IP21-Salzlaugeneluate und der reinen Salzlauge IP21 auf das Blattwachstum von *Lemna* sind in Abbildung 16 als Dosis-Wirkungsbeziehungen angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit sind die Kurven aller übrigen Salzlaugeneluate und der Salzlauge IP9 im Anhang (Abbildungen A9-A11) dargestellt. In Abbildung 17 werden jedoch die Effekte aller mit *Lemna* untersuchten Salzeluate und der reinen Salzlösungen als  $EC_{50}$ -Werte gezeigt.



**Abbildung 16: Der *Lemna*-Test: Beeinträchtigungen des Blattwachstums durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient



**Abbildung 17: Hemmung des Blattwachstums von *Lemna minor* durch zwei verschiedene Salzlaugen und auf diesen basierende Abfalleluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

Die beiden reinen Salzlaugen IP9 und IP21 verursachten eine starke Hemmung des Blattwachstums. Hierbei unterschieden sich die Wirkungen der unterschiedlich zusammengesetzten Salzlaugen IP9 und IP21 nicht voneinander.

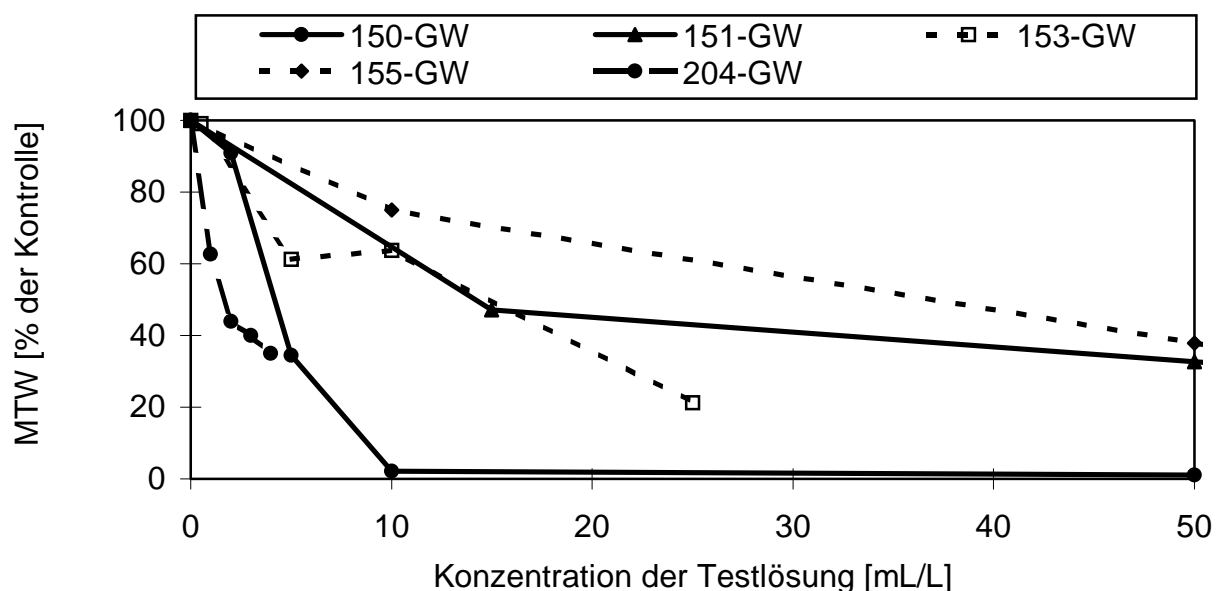
Die Toxizitäten nahezu aller untersuchten Salzlaugeneluats zeigten nur geringe Unterschiede. Darüber hinaus unterschieden sie sich kaum von den Wirkungen der reinen Salzlösungen oder waren sogar geringer toxisch als diese. Lediglich die beiden Salzlaugeneluats des Abfalles Nr. 202 (E-Filterstaub aus Sonderabfallverbrennung) waren deutlich toxischer als die reinen Salzlaugen.

### 3.2.3.2 Eignung des *Lemna*-Blattwachstumstests zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluats

Aufgrund der hohen Salzempfindlichkeit und der hemmenden Eigenschaft der Salzmatrix über konnte die Wirkung der Schwermetalle mit dem *Lemna*-Blattwachstumstest nicht eindeutig bestimmt werden. Daher ist dieser Test nicht zur Beurteilung von salinen UTD-relevanten Abfalleluats geeignet.

### 3.2.3.3 Grundwassereluats

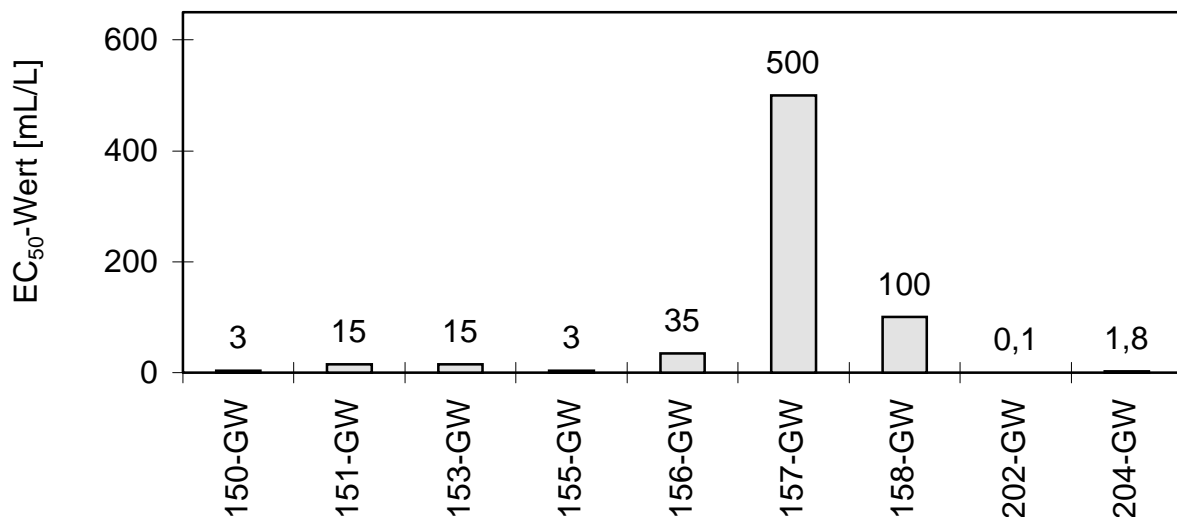
In Abbildung 18 ist die Wirkung einiger ausgewählter Grundwassereluats in Abhängigkeit ihrer eingesetzten Konzentration auf das Blattwachstum von *Lemna* angegeben. Die Ergebnisse zu den dort nicht aufgeführten Grundwassereluats sind im Anhang (Abbildung A12) dargestellt. In Abbildung 19 werden jedoch die Effekte aller mit *Lemna* untersuchten Grundwassereluats als EC<sub>50</sub>-Werte wiedergegeben.



**Abbildung 18: Beeinträchtigungen des Blattwachstums von *Lemna* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluats auf Basis von Grundwasser.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient





**Abbildung 19: Hemmung des Blattwachstums von *Lemna minor* durch verschiedene Grundwassereluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

Alle untersuchten Grundwassereluate erwiesen sich als toxisch oder hemmend für *Lemna*. Gemessen am EC<sub>50</sub>-Wert unterschieden sich die Toxizitäten der einzelnen Eluate sehr stark voneinander. Während das am geringsten hemmende Eluat (157-GW) einen EC<sub>50</sub>-Wert von 500 mL/L aufwies, zeigte das am stärksten toxische Eluat (202-GW) ein um den Faktor  $10^3$  geringerer EC<sub>50</sub>-Wert (0,1 mL/L).

### 3.2.3.4 Vergleich der Salzlaugeneluate mit den Grundwassereluiten

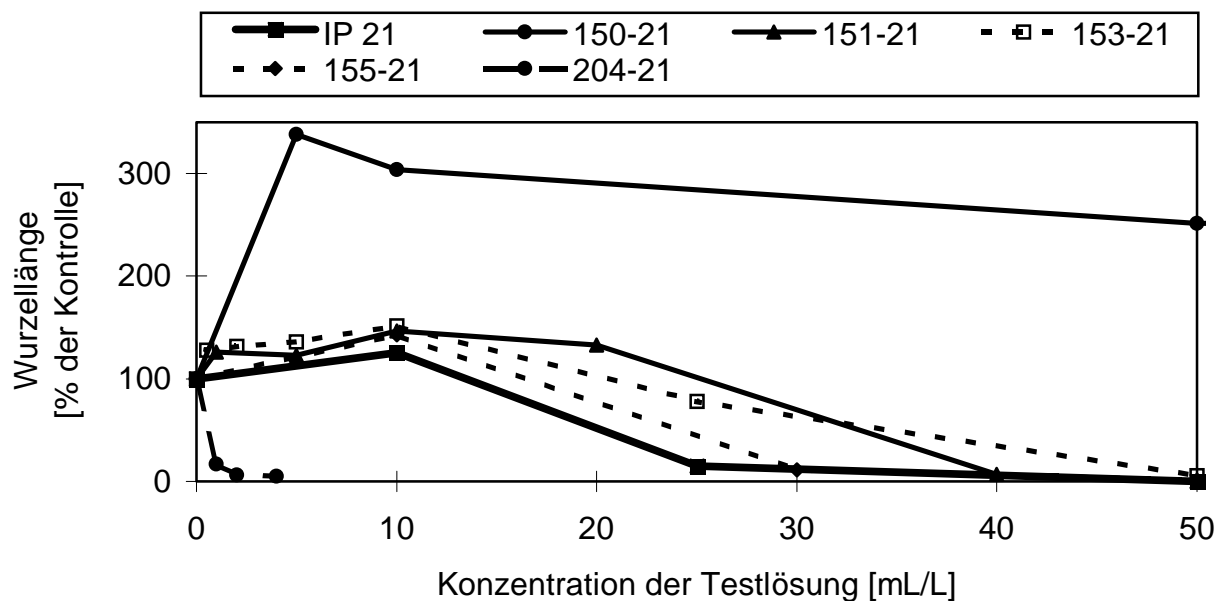
Mit Ausnahme der beiden Salzlaugeneluate des Abfalls Nr. 202 (E-Filterstaub aus Sonderabfallverbrennung) ließ der *Lemna*-Blattwachstumstest keine Beurteilung der Schwermetalleffekte zu, da die Wirkung der Schwermetalle und sonstigen toxischen Komponenten vom starken Salzeffekt überlagert wurden. Aus diesem Grund war ein Vergleich der unterschiedlichen Elutionsmittel nicht sinnvoll.

## 3.2.4 *Lepidium*-Wurzellängentest

### 3.2.4.1 Salzlaugeneluate

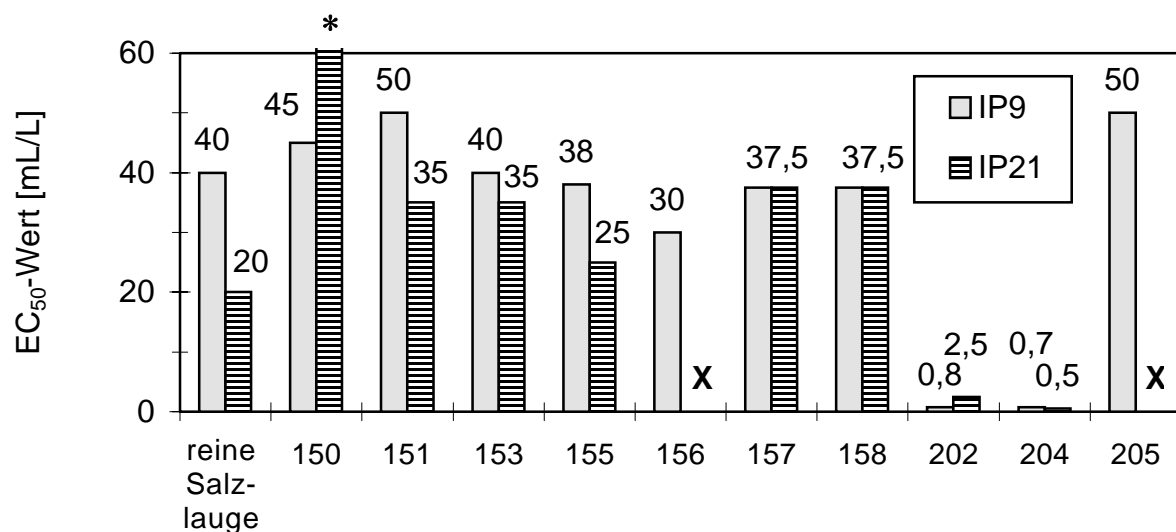
In Abbildung 20 sind die Effekte einiger ausgewählter Lösungen auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium* als Dosis-Wirkungsbeziehungen dargestellt. Die Kurven zu den übrigen Salzlaugeneluiten und der Salzlauge IP9 werden im Anhang (Abbildungen A13-A15) angegeben. Die Wirkungen aller untersuchten

Salzeluat und der reinen Salzlösungen auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium* sind in Abbildung 21 als  $EC_{50}$ -Werte dargestellt.



**Abbildung 20: Der *Lepidium*-Test: Beeinträchtigungen der Wurzellänge durch saline UTD-relevante Abfalleluat auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



**Abbildung 21: Hemmung des Wurzellängenwachstums von *Lepidium sativum* durch zwei verschiedene Salzlaugen und auf diesen basierende Abfalleluat.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als  $EC_{50}$ -Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der  $EC_{50}$ -Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der  $EC_{50}$ -Werte in mL/L angegeben. \*: Für dieses Eluat wurde aufgrund seiner Wachstumsstimulation (abnormes Streßwachstum) kein  $EC_{50}$ -Wert ermittelt.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

Auch im Fall von *Lepidium* übten beide reinen Salzlösungen einen schädigenden Einfluß aus, wobei die IP21-Lauge eine stärkere Reduktion der Wurzellänge als die IP9-Lauge verursachte.

Nur die Abfalleluate (202-IP9/21 und 204-IP9/21) zeigten eine deutlich größere Hemmwirkung als die reinen Salzlösungen. Bei allen anderen Lösungen konnte nicht zwischen der Wirkung des Salzes und derjenigen der Schwermetalle unterschieden werden, da der Salzeffekt, ähnlich wie bei dem Testorganismus *Lemna*, den der Schwermetalle überlagerte. Einige Eluate (150-IP9, 151-IP9/21, 153-IP21, 157-IP21, 158-IP21 und 205-IP9) führten sogar zu einem größeren  $EC_{50}$ -Wert als die korrespondierende reine Salzlauge.

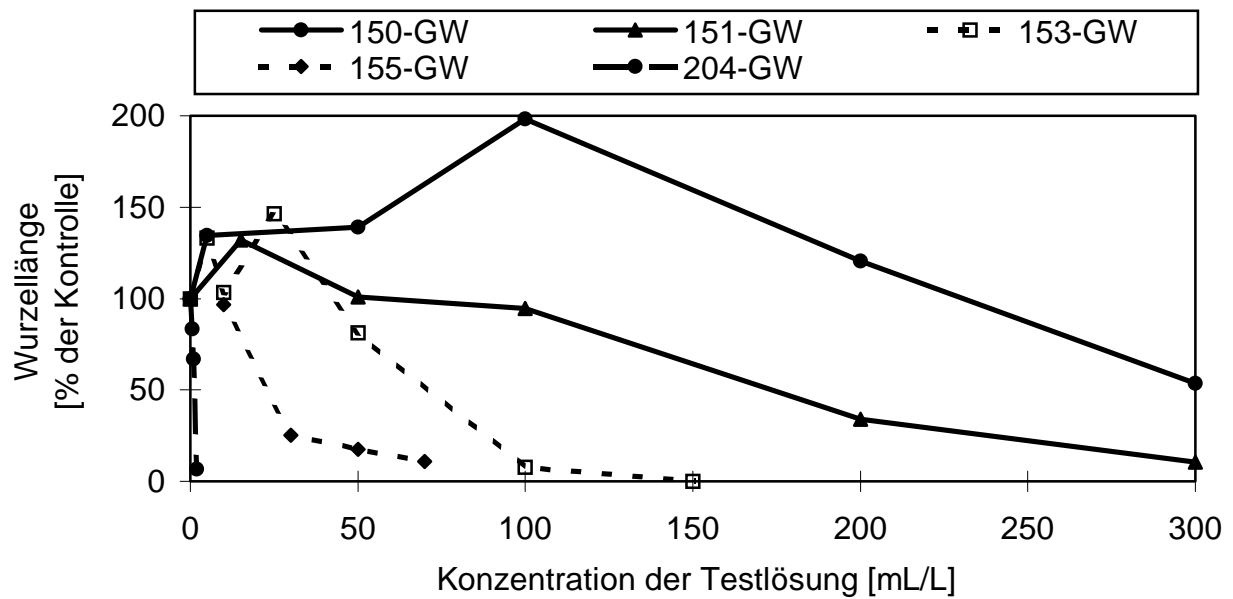
Ein weiteres Phänomen wurde bei Einsatz von Eluat 150-IP21 deutlich. Dieses Eluat bewirkte eine deutliche Verlängerung der Wurzeln auf über das dreifache (Abbildung 20). Da der Durchmesser der Wurzeln gleichzeitig um ca. 75 % verglichen mit den Wurzeln der Kontrollpflanzen verringert war, konnte es sich hier nicht um ein verbessertes Wachstum durch gesteigertes Nährstoffangebot handeln. In einem solchen Fall würde sich der Durchmesser der Wurzeln nicht verändern. Aus diesem Grund wurde dieser Effekt als abnormes Streßwachstum angesehen.

#### **3.2.4.2 Eignung des *Lepidium*-Wurzellängentest zur Bewertung saliner UTD-relevanter Abfalleluate**

Aufgrund der hohen Salzempfindlichkeit und der häufigen Überlagerung der hemmenden Eigenschaft der Salzlösungen über die der Schwermetalle konnte die Wirkung der Schwermetalle mit dem *Lepidium*-Wurzellängentest nicht eindeutig bestimmt werden. Daher ist dieser Test nicht zur Beurteilung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten geeignet.

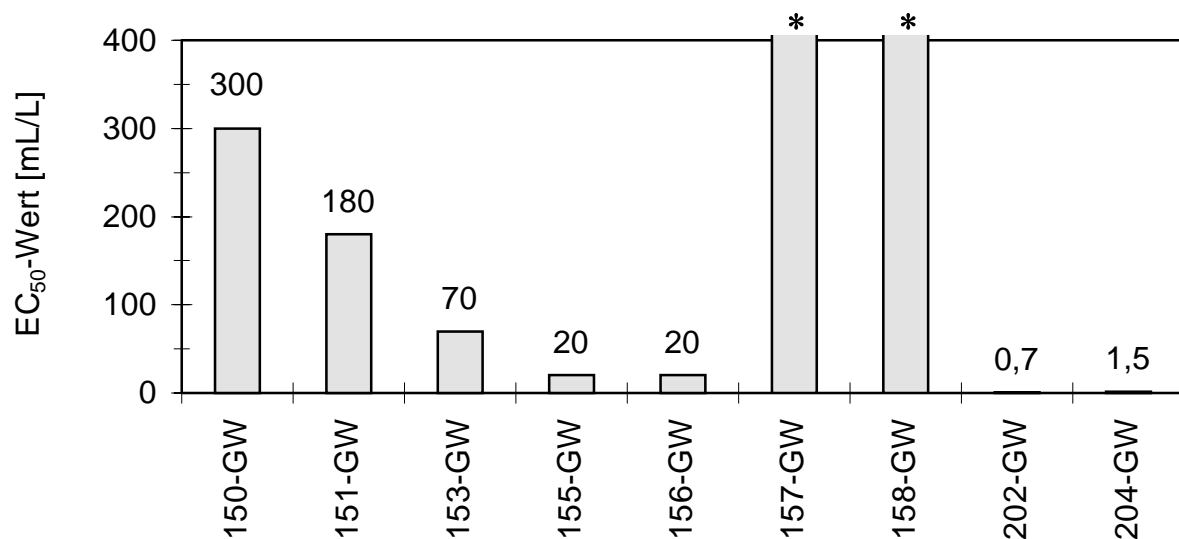
#### **3.2.4.3 Grundwassereluate**

Die direkten Meßergebnisse zur Hemmung einiger ausgewählter Grundwassereluate auf die Wurzellänge von *Lepidium* sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Kurven zu den restlichen Eluaten sind im Anhang (Abbildung A16) wiedergegeben. Die  $EC_{50}$ -Werte zur Betrachtung aller Effekte der mit *Lepidium* untersuchten Grundwassereluate werden in Abbildung 23 gezeigt.



**Abbildung 22: Beeinträchtigungen des Wurzellängenwachstums von *Lepidium sativum* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis von Grundwasser.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode.



**Abbildung 23: Hemmung des Wurzellängenwachstums von *Lepidium sativum* durch verschiedene Grundwassereluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

\*: Für diese Eluate konnte aufgrund ihrer geringen Toxizität kein EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden.

Die untersuchten Grundwassereluate übten eine unterschiedlich starke Hemmung auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium* aus. Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte

variierten in einem großen Bereich von sehr toxischen Eluaten mit  $EC_{50}$ -Werten von 0,7 mL/L bis zu relativ wenig toxischen ( $EC_{50}$ -Wert von 300 mL/L). Bei allen Grundwassereluaten mit Ausnahme von 202-IP9/21 und 204-IP9/21 kam es in niedrigen Konzentrationsbereichen (unter 25 mL/L) zu einer Stimulation des Wurzellängenwachstums, bei höheren Konzentrationen wirkten jedoch auch diese Eluate wachstumshemmend.

Zwei der untersuchten Grundwassereluete (157-GW und 158-GW) zeigten auch unverdünnt noch keine toxischen Effekte.

#### **3.2.4.4 Vergleich der Salzlaugeneluete mit den Grundwassereluaten**

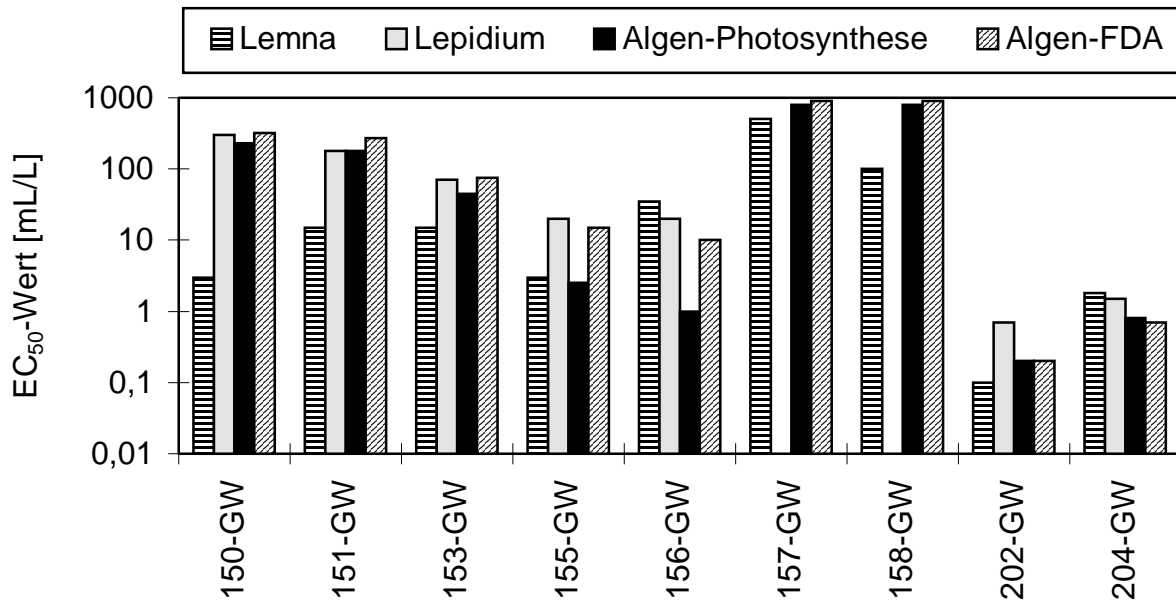
Mit Ausnahme der Eluate 202-IP9/21 und 204-IP9/21 ließ der *Lepidium*-Wurzellängentest keine eindeutige Beurteilung der Schwermetalleffekte zu, da auch in diesem Ökotoxizitätstest die Wirkung der Schwermetalle und sonstigen toxischen Komponenten von dem starken Salzeffekt überlagert wurde. Aus diesem Grund wurde auf einen Vergleich der unterschiedlichen Elutionsmittel verzichtet.

#### **3.2.5 Vergleich der mit *Lemna*, *Lepidium* und *Chlamydomonas* erzielten Testergebnisse aller Eluate**

##### **3.2.5.1 Vergleich der Wirkungen der Grundwassereluete auf die verschiedenen Testorganismen**

Die neun verschiedenen Grundwassereluete der in Kapitel 2.2.2.2, Tabelle 4 beschriebenen Abfälle wurden mit vier verschiedenen Phytotoxizitätstests (Kapitel 3.2.1 bis 3.2.3) untersucht. In diesem Kapitel wird verglichen, ob sich die mit den unterschiedlichen Tests erzielten Ergebnisse voneinander unterscheiden.

Bei den Untersuchungen der Grundwassereluete existierten keine Beeinflussungen der Testergebnisse durch Salzeffekte. Aus diesem Grund können die Ergebnisse aller durchgeführten Phytotoxizitätstests in Abbildung 24 miteinander verglichen werden.



**Abbildung 24: Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte aller mit dem *Lepidium*-Wurzellängentest, dem *Lemna*-Blattwachstumstest, dem *Chlamydomonas*-Photosynthesetest und dem *Chlamydomonas*-FDA-Test untersuchten Grundwassereluate.**

Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß den in Kapitel 2.3 beschriebenen Standardmethoden. Die Ergebnisse sind als  $EC_{50}$ -Werte in mL/L auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Je kleiner der  $EC_{50}$ -Wert, desto größer die Toxizität des Eluates.

Von den Eluaten 157-GW und 158-GW konnte aufgrund ihrer geringen Toxizität mit dem *Lepidium*-Wurzellängentest kein  $EC_{50}$ -Wert ermittelt werden.

Viele Grundwassereluate erzeugten in den unterschiedlichen angewendeten Tests sehr ähnliche  $EC_{50}$ -Werte. So waren die  $EC_{50}$ -Werte für 150-GW, 151-GW, 153-GW 204-GW, die aus dem *Lepidium* und den beiden *Chlamydomonas*-Tests resultierten nahezu identisch.

Der *Lemna*-Blattwachstumstest reagierte auf sechs der neun getesteten Grundwassereluate von allen eingesetzten Testsystemen am empfindlichsten. Dieser Test erzielte für folgende Grundwassereluate die niedrigsten  $EC_{50}$ -Werte: 150-GW, 151-GW, 153-GW, 157-GW, 158-GW und 202-GW. Die Toxizität der übrigen Grundwassereluate (155-GW, 156-GW, 204-GW) war für den *Chlamydomonas*-Photosynthese- oder FDA-Test am stärksten, so daß mit diesen Tests die geringsten  $EC_{50}$ -Werte ermittelt wurden.

Zwei der Tests wurden mit dem gleichen Testorganismus, *Chlamydomonas*, durchgeführt. Es wurde die Beeinträchtigung der Photosyntheseleistung bzw. die Hemmung der Esteraseaktivität, bzw. die Aufnahme des FDA in die Zellen, betrachtet. Ein Vergleich der mit beiden Tests erzielten Ergebnisse zeigte, daß zwar

bei nahezu allen Grundwassereluaten (sieben von neun) unabhängig vom zugrunde gelegten Testprinzip sehr ähnliche oder identische  $EC_{50}$ -Werte gemessen wurden, es traten aber auch deutliche Differenzen in den ermittelten  $EC_{50}$ -Werten auf: Für die Eluate 155-GW und 156-GW wurden mit beiden auf *Chlamydomonas* basierenden Tests sehr unterschiedliche  $EC_{50}$ -Werte ermittelt.

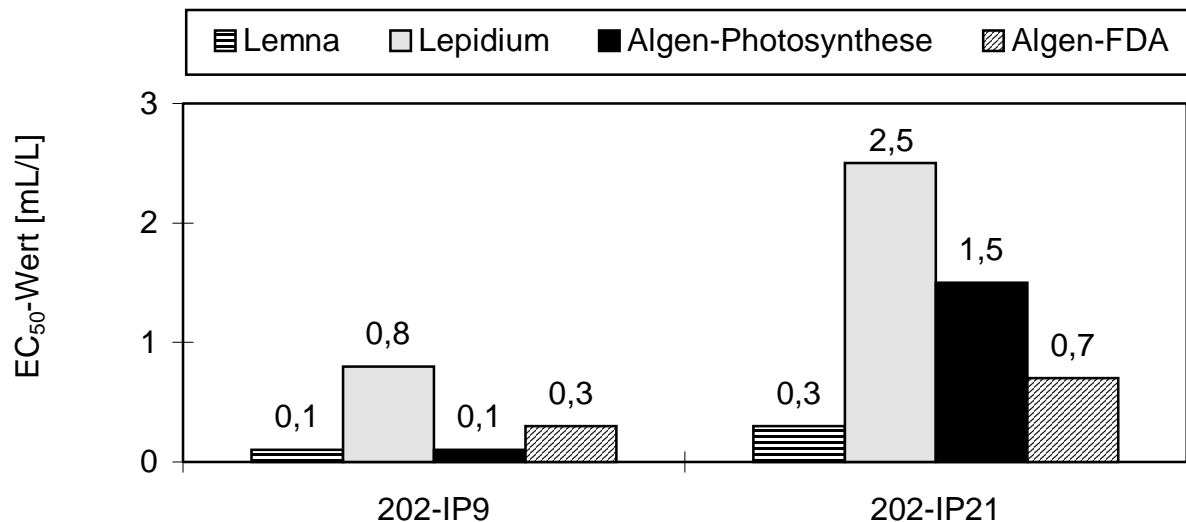
Dieser Vergleich zeigte, daß *Lemna* neben *Chlamydomonas* einen sehr sensiblen Testorganismus zur Bewertung von nicht-salinen Abfalleluaten darstellt.

### 3.2.5.2 Vergleich der Wirkungen der Salzlaugeneluaten auf die Testorganismen

Bei der Bewertung der salinen Abfalleluate mit Phytotoxizitätstests sollte die Wirkung der Schwermetalle in diesen Eluaten sicher erfaßt werden. Hierzu stellte die deutliche Unterscheidung des hemmenden Effektes der Salze von der Toxizität der Schwermetalle die Voraussetzung dar. Dies war jedoch nur dann möglich, wenn die Organismen nicht zu salzempfindlich waren, und die Wirkung der Schwermetalle nicht von derjenigen der Salze überlagert wurde.

Um die Salzempfindlichkeit der Testorganismen zu prüfen, wurden in den beschriebenen Phytotoxizitätstests auch jeweils die Wirkungen der beiden reinen Salzlösungen IP9 und IP21 untersucht.

Während die beiden *Chlamydomonas*-Tests die Toxizität der Schwermetalle in nahezu allen Salzlaugeneluaten detektierten, da zwischen der Hemmwirkung des Salzes und der Toxizität der Schwermetalle differenziert werden konnte (Abbildungen 9 und 13), war dies mit dem *Lepidium*-Test lediglich bei den Eluaten 202-IP9/21 und 204-IP9/21 möglich. Wegen der starken Salzempfindlichkeit des *Lemna*-Tests konnte mit diesem Organismus nur bei den äußerst toxischen Eluaten 202-IP9 und 202-IP21 zwischen der Hemmwirkung des Salzes und der Toxizität der Schwermetalle unterschieden werden (Abbildung 17). Aus diesem Grund stellten 202-IP9 und 202-IP21 die einzigen Salzlaugeneluaten dar, deren Toxizität unabhängig von der Hemmwirkung des Salzes mit allen vier genannten Tests bestimmt werden konnte. Somit konnten auch nur die Wirkungen dieser Eluate auf die unterschiedlichen Tests miteinander verglichen werden. In Abbildung 25 sind die mit diesen vier Methoden ermittelten  $EC_{50}$ -Werte von 202-IP9 und 202-IP21 dargestellt.



**Abbildung 25: Hemmung der Eluate 202-IP9 und 202-IP21 auf das Wurzel-längenwachstum von *Lepidium*, das Blattwachstum von *Lemna*, die Photosyntheserate und die FDA-Spaltung von *Chlamydomonas*.**

Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß den in Kapitel 2.3 beschriebenen Standardmethoden. Die Ergebnisse sind als  $EC_{50}$ -Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der  $EC_{50}$ -Wert, desto größer die Toxizität des Eluates.

Insgesamt betrachtet lagen die mit den unterschiedlichen Organismen oder Methoden ermittelten  $EC_{50}$ -Werte für die Wirkung der Eluate 202-IP9 und 202-IP21 in der gleichen Größenordnung. Dennoch kann festgestellt werden, daß *Lepidium* auf beide Eluate am unempfindlichsten reagierte. *Lemna* stellte für beide Eluate den sensibelsten Test dar, für das Eluat 202-IP9 erreichte aber auch der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest diese Sensibilität. Beide Systeme mit *Chlamydomonas* reagierten mit sehr niedrigen  $EC_{50}$ -Werten und sind damit sehr sensible Methoden.

### 3.2.6 Beeinflussung der Tests mit *Lemna* und *Lepidium* durch die Kulturbedingungen

In den Kapiteln 3.2.3.1 und 3.2.4.1 wurde gezeigt, daß die reinen Salzlösungen auf *Lemna* und *Lepidium* eine starke Hemmung ausübten. Wurden auf Basis dieser Salzlösungen hergestellte Abfalleluate mit diesen beiden Testpflanzen untersucht, so reagierten einige Eluate weniger toxisch als die reinen Salzlösungen (Abbildungen 17 und 21). In einigen Fällen kam es überdies zu einer Stimulation des Wachstums der *Lepidium*-Wurzeln.



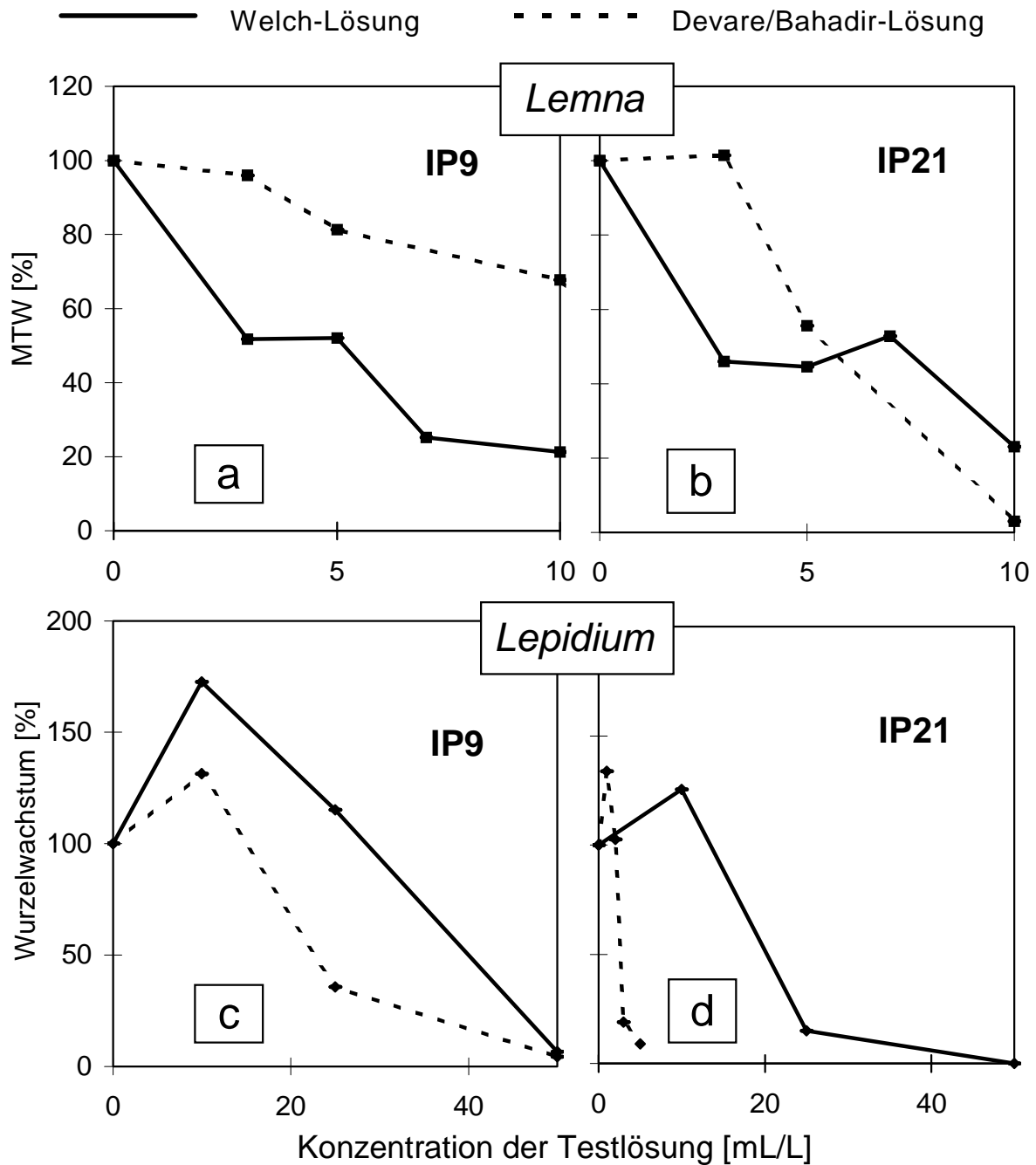
Dieser beobachtete Effekt konnte entweder durch eine direkte Kompensation der Toxizität durch Bestandteile der Eluate hervorgerufen werden, oder es handelte sich hier um eine generelle Wachstumsstimulation, die nur indirekt mit dem toxischen Effekt verbunden war.

Aus der zweiten Annahme könnte gefolgert werden, daß das Wachstum der Testorganismen prinzipiell gesteigert werden kann. Dies könnte durch Schaffung besserer Wachstumsbedingungen, z.B. durch Nährstoffzusatz, als Gegensteuerung der Wachstumshemmung geschehen. Mit der Induzierung eines "Streßwachstums" bietet sich eine weitere Möglichkeit zur Wachstumssteigerung.

Im Folgenden wird gezeigt, daß beide Wege, die Induzierung eines "Streßwachstums" und die Reduzierung von Wachstumseinschränkungen, vorkommen können.

Um weitere Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Nährstoffangebot und wachstumstimulierenden Faktoren zu erhalten, wurden die Tests mit *Lepidium* und *Lemna* mit zwei verschiedenen Nährlösungen durchgeführt: der Welch-Lösung (WELCH et al., 1993), mit der alle übrigen Test durchgeführt wurden und die hohe Nitrat- und niedrige Phosphatkonzentrationen enthält, und einer Nährlösung nach DEVARE und BAHADIR (1994) mit hohen Phosphat und niedrigen Nitratkonzentrationen und zusätzlich hohen Eisenchloridgehalten (Kapitel 2.1.2, Tabelle 1).

In Abbildung 26 a bis d sind die Wirkungen der beiden reinen Salzlösungen IP9 und IP21 auf *Lemna* und *Lepidium* unter Verwendung der beiden Nährlösungen dargestellt.



**Abbildung 26 a bis d: Hemmung des Blattwachstums von *Lemna* und des Wurzellängenwachstums von *Lepidium* durch die beiden Salzlösungen IP9 und IP21 unter Verwendung zweier verschiedener Nährlösungen.**

Die Wirkungen der beiden Salzlösungen wurden nach der in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Methode getestet. Als Nährlösung wurde jedoch zusätzlich die Lösung nach Devare und Bahadir (Kapitel 2.1.2) verwendet.

Abbildung 26 a bis d zeigt, daß auf der einen Seite die Salzeempfindlichkeit von *Lemna* in der Devare/Bahadir-Lösung geringer als in der Welch-Lösung war (Abbildung 26 a), auf der anderen Seite wurde jedoch das Wurzelwachstum von *Lepidium* in der Devare/Bahadir-Lösung stärker gehemmt (Abbildung 26 c/d). Daher mußten mindestens zwei Faktoren an der Hemmung des Wachstums beteiligt sein.

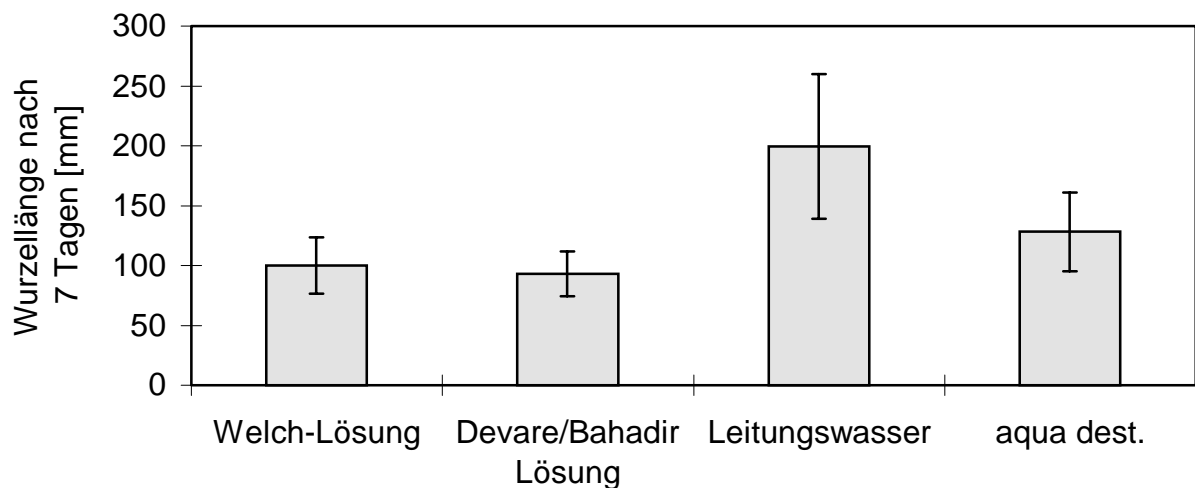
Darüber hinaus führte unabhängig von der verwendeten Nährlösung eine geringe Konzentration der Salzlösungen zu einer Verstärkung des Wurzelwachstums von *Lepidium* (Abbildung 26 c/d).

Diese Wachstumssteigerung könnte theoretisch durch die Kompensation von wachstumsstimulierenden Nährstoffen verursacht worden sein. Auch könnte es sich um eine allgemeine Stimulierung des Wachstums durch geringe Konzentrationen von toxischen oder hemmenden Substanzen gehandelt haben.

Ein derartiger Effekt wird "Hormesis" genannt und ist für die Wirkung von geringen Dosen verschiedener Substanzen beschrieben worden (CALABRESE 1998, CALABRESE und BALDWIN 1993 und STEBBING 1982).

Gegen diese beiden genannten möglichen Erklärungen spricht jedoch, daß der Wurzeldurchmesser der verlängerten Wurzeln (Abbildung 26 c/d) nur etwa 25 % des Durchmessers der Wurzeln der Kontrollpflanzen betrug. Aus diesem Grund ist es eher wahrscheinlich, daß es sich in diesem Fall um die Induktion eines abnormen Streßwachstums handelte.

Ein ähnliches streßinduziertes Wachstum zeigte sich auch bei der Kultivierung von *Lepidium* in Leitungswasser und aqua dest. (Abbildung 27).

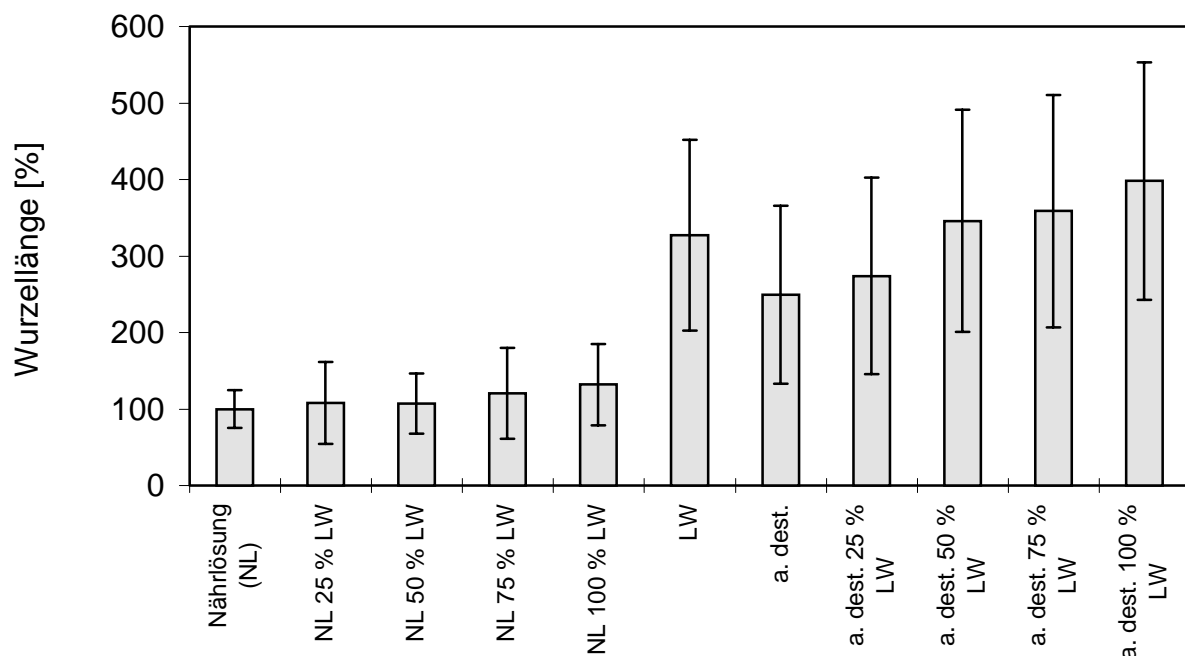


**Abbildung 27: Einfluß verschiedener Nährlösungen sowie von Leitungs- und destilliertem Wasser auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium*.**

Der Test basierend auf der Welch-Lösung ist gemäß dem in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardverfahren ohne Verwendung einer toxischen Testlösung durchgeführt worden. Darüber hinaus sind an Stelle der Welch-Lösung die Nährlösung nach Devare/Bahadir (Kapitel 2.1.2) sowie Leitungswasser und aqua dest. ohne weitere Zusätze eingesetzt worden. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je 50 voneinander unabhängigen Messungen an.

Das Streßwachstum war in Leitungswasser stärker als in destilliertem Wasser. Zusätzlich zu dem osmotischen Streß, der zu einer Wurzelverlängerung führen kann (MEYER et al. 1989; LEIDI und GUTIERREZ 1994), war hier noch ein weiterer Faktor wirksam, der ausschließlich im Leitungswasser enthalten war.

Wenn ein konkreter Stoff im Leitungswasser das beobachtete Streßwachstum induzierte, dann hätte es durch den Zusatz von gefriergetrocknetem Leitungswasser zu anderen Lösungen möglich sein können, eine Wurzelverlängerung zu induzieren. Dies wurde überprüft, indem zu der Welch-Lösung und zu aqua dest. gefriergetrocknetes Leitungswasser in verschiedenen Volumenanteilen zugesetzt wurde (Kapitel 2.2.2.5) und mit diesen Lösungen ein *Lepidium*-Test durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 28 wiedergegeben.



**Abbildung 28: Einfluß von Rückständen aus gefriergetrocknetem Leitungs- und destilliertem Wasser auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium sativum*.**

*Lepidium*-Samen wurde in Welch-Nährlösung bzw. aqua dest. ohne Zusätze und unter Zugabe unterschiedlicher Mengen gefriergetrockneten Leitungswasserrückständen (Kapitel 2.2.2.5) kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Wurzellängen der *Lepidium*-Keimlinge bestimmt.

NL: Nährlösung; LW: Leitungswasser; a. dest.: destilliertes Wasser.

Erläuterung der Angaben in % (z.B. NL 25 % LW): 25 mL Leitungswasser wurden gefriergetrocknet und der Rückstand anschließend mit 100 mL Nährlösung aufgefüllt.

Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je 20 voneinander unabhängigen Versuchen an.

Die Zugabe der Rückstände aus gefriergetrockneten Leitungswasser zu der Welch-Lösung führte zwar zu einer geringen Steigerung der Wurzellänge, doch bleibt das

Wurzelwachstum selbst bei höchstem Zusatz der gefriergetrockneten Leitungswasserrückstände zur Welch-Lösung (100 mL Leitungswasser werden gefriergetrocknet und anschließend mit 100 mL Welch-Lösung aufgefüllt) weit unterhalb der Wurzellänge der Kontrolle mit reinem Leitungswasser.

Der Zusatz des gefriergetrockneten Leitungswassers zu aqua dest. hingegen induzierte ein Streßwachstum, das noch über die durch aqua dest. induzierte Wurzellängensteigerung hinaus ging. Dieser Effekt war direkt vom zugesetzten Leitungswasseranteil abhängig, so daß es mit steigenden Leitungswasseranteilen zu einer Wurzellängenzunahme kam. Allerdings sind die Standardabweichungen dieses Versuches sehr groß.

Dieses Ergebnis führt zu der Schlußfolgerung, daß in dem verwendeten Leitungswasser tatsächlich Substanzen enthalten waren, die ein Streßwachstum von *Lepidium*-Wurzeln induzierten.

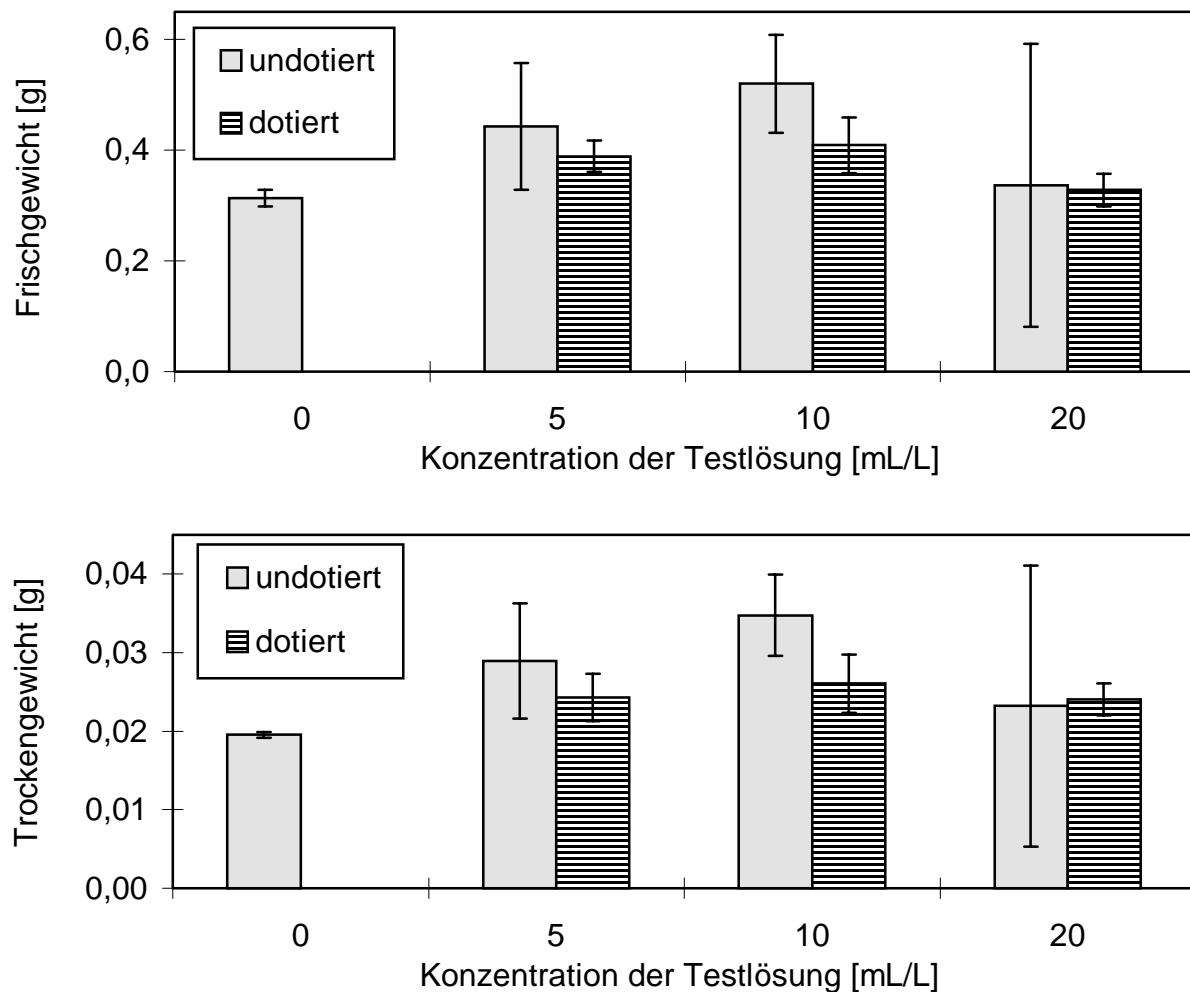
Diese Versuche zeigten, daß die Ergebnisse der Phytotoxizitätstests mit *Lemna* und *Lepidium* von der Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums beeinflusst werden konnten. Das Wurzelwachstum von *Lepidium* wurde nicht nur durch den Einfluß von toxischen Substanzen vermindert, sondern konnte durch verschiedene Faktoren auch stimuliert werden.

### **3.2.7 Terrestrischer Pflanzenwachstumstest nach OECD**

Der Terrestrische Pflanzenwachstumstest nach OECD stellt im GSF-Breicht 40/93 (STEINBERG et al. 1993) den einzigen terrestrischen Phytotoxizitätstest dar, der zur Untersuchung von schwermetallhaltigen Eluaten eingesetzt werden kann. Aus diesem Grund wurde seine Eignung für die vorliegenden UTD-relevanten Abfalleluate überprüft.

Zur Ermittlung der grundsätzlichen Eignung des Testverfahrens wurden nicht die verschiedenen Eluate der authentischen Abfälle verwendet, da diese nur in begrenzten Mengen vorhanden waren. Statt dessen wurde eine synthetisch mit Schwermetallen dotierte IP21-Lauge (Kapitel 2.2.2.3) verwendet. Die Schwermetallkonzentration dieser dotierten IP21-Lauge entsprach den von REICHELT et al. (1995) in IP21-Eluaten von Rückständen aus der Abfallverbrennung durchschnittlich ermittelten Schadstoffmengen. Sie konnte daher stellvertretend für viele UTD-relevante Abfalleluate untersucht werden.

Der Wachstumstest wurde mit drei verschiedenen Pflanzenarten durchgeführt: Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*), Rettich (*Raphanus sativus*) und Gartenkresse (*Lepidium sativum*). Da sich die Effekte auf die einzelnen Arten nicht qualitativ voneinander unterscheiden, wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nur der Test mit *Raphanus sativus* vorgestellt (Abbildung 29). Die Ergebnisse zu den anderen Pflanzenarten sind im Anhang (Tabelle A1) dargestellt.



**Abbildung 29: Frisch- und Trockengewicht von *Raphanus sativus* bei Zugabe einer undotierten und einer mit Schwermetallen dotierten Salzlauge.**

Dieser Test erfolgte gemäß der Richtlinie der OECD Guidelines For Testing Chemicals Nr. 208 (Kapitel 2.3.4). Als undotierte Salzlauge wurde IP21 eingesetzt, als dotierte eine IP21-Lösung, die synthetisch mit Schwermetallen versetzt wurde (Kapitel 2.2.2.3). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je neun voneinander unabhängigen Versuchen an.

Die Zugabe sowohl der undotierten als auch der dotierten Salzlauge führte anfangs zu einer Steigerung des Frisch- und Trockengewichtes in Form eines "Streßwachstums". Dieser Effekt trat bei größeren Konzentrationen der Testlösungen (20 mL/L) nicht mehr auf.

Insgesamt ergab sich sowohl beim Frisch- wie auch beim Trockengewicht zwischen der undotierten und der dotierten Salzlauge kein signifikanter Unterschied.

Der Pflanzenwachstumstest ist zur Beurteilung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten nicht geeignet. Mit diesem Testverfahren können nicht die Schädigungen durch die Schwermetalle erfaßt werden, da sie vom Effekt der Salzmatrix überlagert werden. Aus diesem Grund wurden die Eluate aus authentischen Abfallproben mit diesem Test nicht weiter untersucht.

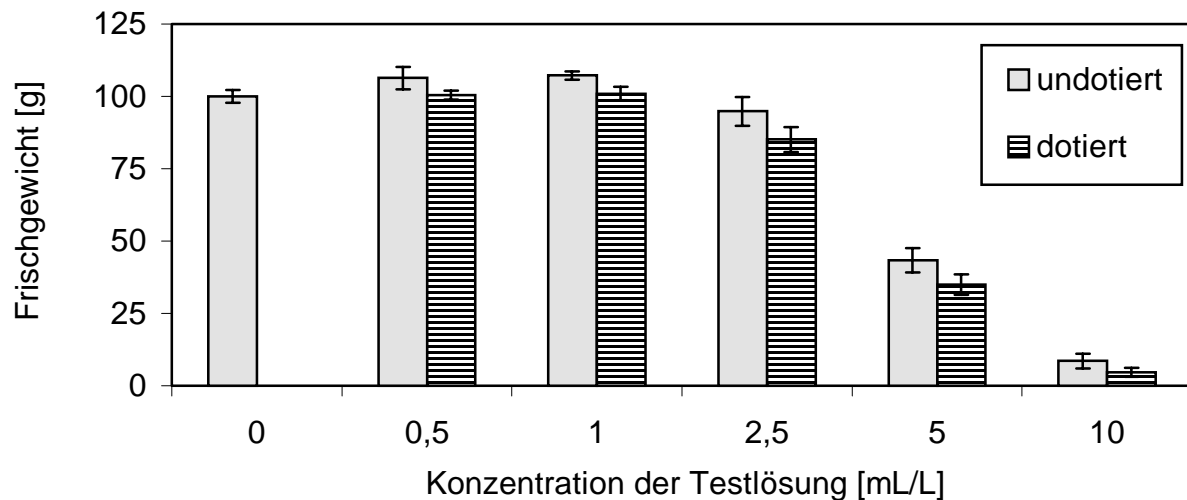
Dies führt jedoch nicht zu einer allgemeinen Unbrauchbarkeit des Tests und läßt eine Anwendung für Testlösungen wie z.B. nicht saline Abfalleluate zu.

### **3.2.8 Zellkultur-Test**

Tests auf der Basis von Zellkulturen wurden bereits mit sehr verschiedenen Substanzen durchgeführt. HARMS (1992) untersuchte die Wirkung von Xenobiotika auf intakte Weizenpflanzen und Zellkulturen von Weizen. SHIRAZI et al. (1994) führten grundlegende Untersuchungen zur Wirkung von Cadmium und Kupfer auf unterschiedliche Zellkulturen durch.

Wie schon beim terrestrischen Pflanzenwachstumstest beschrieben, wurde zur Überprüfung der Eignung des Zellkultur-Phytotoxizitätstests für saline UTD-relevante Abfalleluate die mit Schwermetallen dotierte IP21-Lauge verwendet.

Um die Sensibilität der Zellkultur gegenüber Salz zu testen, wurde neben der mit Schwermetall versetzten Lauge auch die undotierte IP21-Lauge eingesetzt (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Einfluß der undotierten und einer mit Schwermetall dotierten IP21-Salzlauge auf das Wachstum einer *Nicotiana*-Zellkultur.**

Der Versuch wurde gemäß der in Kapitel 2.3.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

Die *Nicotiana*-Zellkultur reagierte sehr empfindlich auf eine Erhöhung der Salzkonzentration im Medium. Der Zusatz der undotierten Salzlauge hemmte bereits ab einer Konzentration von 2,5 mL/L das Wachstum der Zellen. Bei einer Konzentration von 10 mL/L waren Zellwachstum und -vermehrung nahezu vollständig unterbunden.

Der Einsatz der dotierten IP21-Salzlauge führte zu einer kaum stärkeren Hemmung des Wachstums als durch die undotierte Lauge. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der Meßergebnisse folgt, daß sich undotierte und dotierte Salzlaugen in ihrer Hemmeigenschaft auf das Zellwachstum nicht voneinander unterscheiden.

Durch die hohe Salzempfindlichkeit der Zellen konnte demnach die Wirkung der Schwermetalle nicht von derjenigen der Salzfracht unterschieden werden. Aus diesem Grund eignet sich der beschriebene Zellkultur-Test nicht für saline UTD-relevante Abfalleluat.



### 3.3 Untersuchungen an *Nicotiana tabacum*

#### 3.3.1 Eignung des Chlorophyllfluoreszenztests mit *Nicotiana* zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten

Der Vergleich der Wirkungen der Abfalleluate auf die drei unterschiedlichen Organismen *Lemna*, *Lepidium* und *Chlamydomonas* zeigte, daß es große Unterschiede in den ermittelten  $EC_{50}$ -Werten geben kann. Diese Differenzen waren auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen der Abfalleluate zurückzuführen, die nicht mit jedem Testsystem einheitlich gut erfaßt werden konnten. Wirkt ein Abfalleluat sich z.B. hauptsächlich hemmend auf den Langstreckentransport aus, so wird dieser Effekt mit *Chlamydomonas* nicht erfaßt. Umgekehrt wird die Schädigung auf den Photosyntheseapparat mit dem *Chlamydomonas*-Photosynthesetest direkt detektiert, mit den beiden verwendeten Tests an *Lemna* und *Lepidium* hingegen erst sekundär.

Um die möglichen komplexen Wirkweisen der Abfalleluate auf höhere Pflanzen zu untersuchen, wurden an einem Modellsystem (Pflanzen von *Nicotiana tabacum*) pflanzenphysiologische Analysen durchgeführt.

Die Basis dieser Arbeiten stellte die Messung der Chlorophyllfluoreszenz der Blätter dar. Der Photosyntheseapparat reagiert sehr sensibel auf eine Störung durch vielfältige Streßfaktoren, wie z.B. Trockenheit, Herbizide, Schwermetalle, Luftverunreinigungen, Hitze und Kälte. Eine Methode, mit der auch geringste Änderungen des Photosyntheseapparates detektiert werden können, bietet sich in der Messung der Chlorophyllfluoreszenzkinetik. Nahezu jede Beeinträchtigung der Photosyntheseleistung spiegelt sich unabhängig von ihrer Position in einer Veränderung eines meßbaren Parameters der Chlorophyllfluoreszenz wieder.

Die Photosyntheseleistung ihrerseits ist abhängig von der Funktion vieler anderer Stoffwechselvorgänge. Somit war zu erwarten, daß durch die Messung der Chlorophyllfluoreszenz an *Nicotiana* als Modellsystem einer terrestrischen Pflanze mit ausgeprägter Gewebe- und Organdifferenzierung eine Vielzahl von möglichen Wirkorten eines Schadstoffes erfaßt werden konnte. Darüber hinaus bot diese Meßmethode den Vorteil, daß kontinuierliche Untersuchungen erfolgen konnten, ohne einen zerstörenden Eingriff in die Pflanze vornehmen zu müssen.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wird bereits seit einiger Zeit auch als Ökotoxizitätstest angewendet, meistens als Tests auf den schädigenden Einfluß von Herbiziden und Luftverunreinigungen (Ozon, SO<sub>2</sub>) auf Pflanzen (LEE 1991; SCHMIDT et al. 1990; ENNIS et al. 1990; RUTH 1990). Effekte, die durch Salz- und Schwermetallbelastung hervorgerufen werden, spielen bislang bei der Anwendung der Chlorophyllfluoreszenz als Meßmethodik eine untergeordnete Rolle (OUZOUNIDOU 1993; SGARDELIS et al. 1994; KRUPA et al. 1992).

Bevor mit Hilfe der Messung der Chlorophyllfluoreszenz an *Nicotiana* weitergehende Untersuchungen zur Wirkung der Abfalleluate durchgeführt werden konnten, mußte jedoch überprüft werden, ob dieses System als Phytotoxizitätstest zur Bewertung der Abfalleluate geeignet war, d.h. ob die Effekte der Schwermetalle in den Eluaten detektiert werden konnten.

Im Folgenden wird zunächst die Anpassung des *Nicotiana*-Fluoreszenztests an die Versuchsbedingungen geschildert. Im Anschluß daran wird die Überprüfung der Eignung dieses Tests zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten beschrieben, bevor auf die Ergebnisse der weiteren pflanzenphysiologischen Untersuchungen an diesem System eingegangen wird.

Die Randbedingungen für den *Nicotiana*-Fluoreszenztest sollten möglichst einfach gehalten werden. Aus diesem Grund wurden die Pflanzen nicht in Erde sondern in Nährlösungen kultiviert. Hiermit konnten die möglichen Einflüsse des Bodens bei einer Schwermetallapplikation ausgeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil von Hydrokulturen lag darin, daß die Konzentration der zugeführten Schwermetalle genau eingestellt werden konnte. Die Schwierigkeit einer Kultivierung von Pflanzen in Nährlösungen besteht jedoch darin, eine geeignete Lösung zu finden. Bei der Wahl einer Nährlösung spielt neben der Konzentration aller erforderlichen Makro- und Mikroelemente auch die Gesamtionenstärke, der pH-Wert, die Pufferkapazität und die Ionenbalance eine Rolle. Daher wurden 4 verschiedene in der Literatur beschriebene Nährlösungen (Hoagland-Lösung: HOAGLAND und ARNON 1950; Knopsche Nährlösung: STRASBURGER 1983; Nährlösung nach WELCH et al. 1993; Nährlösung nach DEVARE/BAHADIR 1994) auf ihre Eignung für die Tabakkultivierung getestet. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse in späteren *Nicotiana*-Fluoreszenztests mit den übrigen Tests wurde jede Lösung auf den pH-Wert von 6,1 eingestellt.

Als Testkriterium fungierten makroskopisch erkennbare Merkmale (Chlorosen) ebenso wie der Fv/Fm-Parameter der Chlorophyllfluoreszenz. Bei einer ausreichend mit Nährstoffen versorgten und unbelasteten Pflanze treten keine sichtbaren Chlorosen auf, und die Fv/Fm-Werte liegen zwischen 0,8 und 0,84 (BJÖRKMANN und DEMMING 1987). Nur die Kultivierung in der Lösung nach WELCH et al. (1993) (Kapitel 2.1.2, Tabelle 1) führte sowohl zu einem normalen Wachstum als auch zu Fv/Fm-Werten von über 0,8. Daher wurde diese Lösung für alle weiteren Untersuchungen an *Nicotiana* eingesetzt.

Aus der Messung der Chlorophyllfluoreszenz-Induktionskurve können die verschiedenen Parameter erfaßt werden, die zur Beurteilung des Zustandes der Pflanze wichtig sind.

So dient der bereits genannte Fv/Fm-Wert, der näherungsweise der optimalen Quantenausbeute der Photosynthese entspricht, als Grundlage für die Vitalität eines Blattes (BJÖRKMANN und DEMMING 1987). Werden für Fv/Fm hohe Werte erzielt, so ist auch die Quantenausbeute der Photosynthese groß. Dies bedeutet, daß ein hoher Prozentsatz des eingestrahnten Lichtes in Photosyntheseprozesse eingeht. Ein kleiner Wert allerdings zeigt an, daß aufgrund von Schädigungen am Photosyntheseapparat viel Licht ungenutzt bleibt.

Eine weitere wichtige Meßgröße ist der Parameter "Yield". Er stellt näherungsweise ein Maß für die effektive Quantenausbeute der Photosynthese dar.

Desweiteren wird der Vitalitätsindex-Faktor Rfd (Ratio of fluorescence decrease) beschrieben. LICHTENTALER und RINDERLE (1988) fanden heraus, daß eine Schädigung von Pflanzen sich in einer Reduktion des Vitalitätsindex-Faktors Rfd widerspiegelt.

Auch der Parameter  $A_{\max}$  wird zur Streßererkennung genutzt (BOLHÀR-NORDENKAMPF und ÖQUIST 1993). Je kleiner  $A_{\max}$  wird, desto größer sind die Zerstörungen an der Elektronentransportkette.

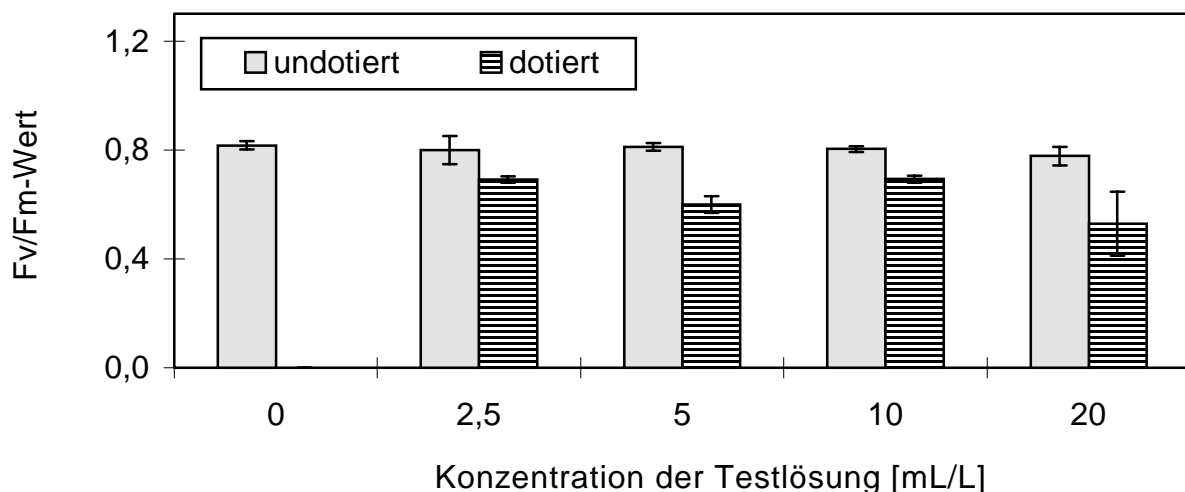
Um zu überprüfen, welche der obengenannten Meßgrößen und Parameter als Basis für einen Ökotoxizitätstest von UTD-relevanten Abfalleluaten geeignet sind, wurden Tabak Pflanzen 4 Wochen lang in einer mit Schwermetall dotierten IP21-Salzlauge (Kapitel 2.2.2.3) kultiviert. Da die Wirkung der Salzmatrix auf *Nicotiana* eine wichtige

Rolle bei der Entscheidung über die Eignung des Tests spielte, erfolgte darüber hinaus auch eine Kultivierung in undotierter IP21-Lauge.

Nach vier Wochen wurde die Chlorophyllfluoreszenz der so behandelten Pflanzen bestimmt. Da eine Messung aller genannten Parameter ca. 20 Minuten dauerte, und eine große Pflanzenanzahl zu messen war, wurde nur die Fluoreszenz des jeweils fünften Blattes von oben gemessen.

### 3.3.1.1 Ergebnisse der Messung des Fv/Fm-Wertes

In Abbildung 31 sind die nach vierwöchiger Kultivierung der Pflanzen in den Testlösungen und der Kontroll-Lösung ermittelten Fv/Fm-Werte angegeben.



**Abbildung 31: Einfluß der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Salzlauge auf den Quotienten Fv/Fm von *Nicotiana*.**

Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode durchgeführt. Angegeben sind die Fv/Fm-Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

Die undotierte Salzlauge hatte bei den eingesetzten Konzentrationen nur minimale Auswirkungen auf diesen Quotienten und damit auf die optimale Quantenausbeute der Tabakpflanzen. Bei Einsatz der mit Schwermetallen dotierten Salzlauge ergab sich eine konzentrationsabhängige Verminderung des Quotienten (mit Ausnahme der Messung für 10 mL/L) der sich jeweils von dem für die reinen Salzlauge unterschied.

Bei der Beurteilung dieses Ergebnisses muß berücksichtigt werden, daß eine Reduzierung des Fv/Fm-Wertes von 0,83 auf Werte unter 0,7 bereits eine

gravierende Schädigung des Photosyntheseapparates anzeigt. Eine Testlösung, die zur Reduktion des Fv/Fm-Wertes von 0,8 um z.B. 50 % auf 0,4 führt, ist daher als deutlich toxischer zu bewerten als eine Lösung, die z.B. das *Lemna*-Blattwachstum um 50 % hemmt.

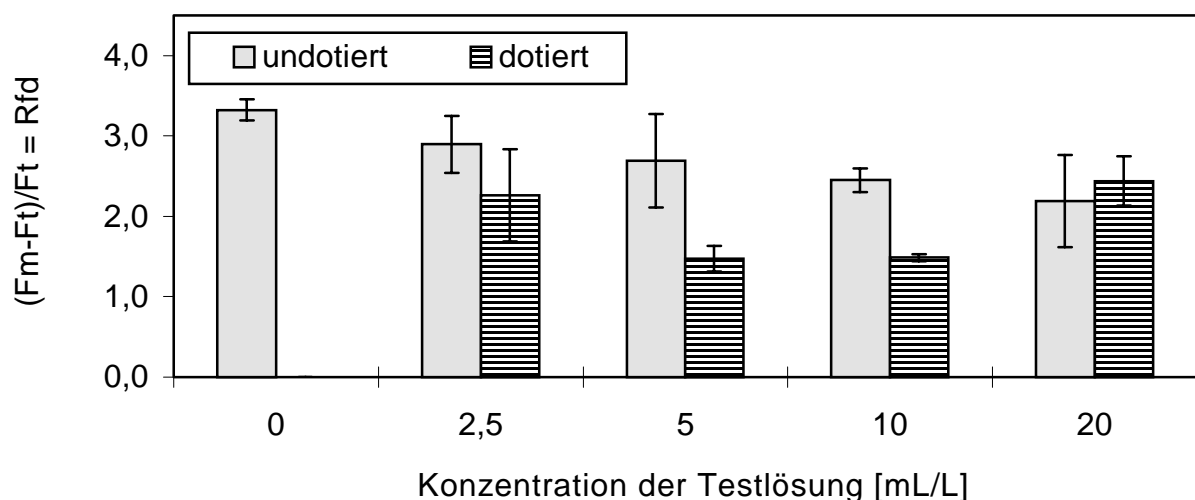
Aus diesem Grund war die Abnahme der Fv/Fm-Wertes im beschriebenen Test auf bis zu 0,5 bereits als Ausdruck einer sehr starken Schädigung zu bewerten.

Da die reine Salzlösung die optimale Quantenausbeute kaum beeinflusste (Es kam maximal zu einer Reduzierung des Fv/Fm-Wertes um ca. 5 % verglichen mit der Kontrolle.), war die Senkung der Quantenausbeute durch die dotierte IP21-Lösung allein auf das Vorhandensein der Schwermetalle zurückzuführen.

Daher stellte die Messung des Quotienten Fv/Fm einen geeigneten Parameter dar, um die Schädigung durch saline UTD-relevante Abfalleluate zu bewerten.

### 3.3.1.2 Effekte der Testlösungen auf den Streßparameter Rfd

In Abbildung 32 werden die Ergebnisse der Messung des Vitalitätsindex-Faktor Rfd dargestellt.



**Abbildung 32: Wirkung der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Salzlauge auf den Vitalitätsindex-Faktor Rfd von *Nicotiana*.**

Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode durchgeführt. Angegeben sind die Rfd-Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

Eine Erhöhung der Konzentration der undotierten Salzlauge führte zu einer Verminderung des Rfd-Wertes. Im Gegensatz zur Messung des Fv/Fm-Wertes, mit

dem der Einfluß der undotierten Salzlauge auf die Vitalität nicht erfaßt wurde, detektierte der Vitalitätsindex-Faktor Rfd die Wirkung der undotierten Salzlauge.

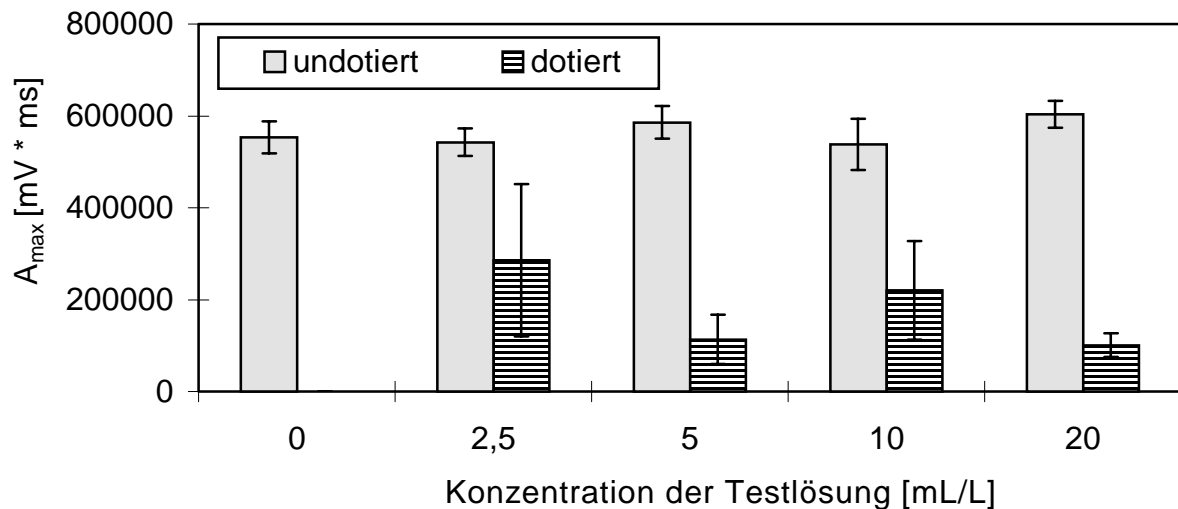
Verglichen mit der undotierten Salzlauge verursachte die dotierte jedoch noch eine deutlich größere Reduzierung des Rfd, so daß durch die Bestimmung des Vitalitätsindex Rfd die Wirkung der Salze von derjenigen der Schwermetalle eindeutig unterschieden werden konnte.

Eine Ausnahme bildete die Messung bei 20 mL/L, bei der Rfd für die dotierte Salzlauge wieder anstieg. Die Zunahme des Rfd ist durch den Einfluß der dotierten Salzlauge auf Ft zu erklären, einem Parameter, der neben Fm zur Berechnung von Rfd verwendet wird:  $Rfd = (Fm - Ft) / Ft$ . Ab einem bestimmten Schädigungsgrad sank der Wert für Ft plötzlich stark ab. Dieser niedrige Wert für Ft ist ein Zeichen dafür, daß eine umfassende Zerstörung einiger Komponenten der Elektronentransportkette eingetreten ist. Da Ft jedoch auch im Nenner in die Berechnung des Rfd eingeht, erhöht sich somit gleichzeitig der Wert für Rfd.

Die Bestimmung des Vitalitätsindex-Faktor Rfd führte zur Bestimmung der Schwermetallwirkung unabhängig von einem ebenfalls erkennbaren Salzeinfluß, so daß dieser Faktor zur Untersuchung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten geeignet war. Einen Nachteil der Ermittlung von Rfd stellte die lange Meßdauer von mindestens 15 Minuten pro Blatt dar.

### **3.3.1.3 Erfassung der Meßgröße $A_{max}$**

Durch die Aufnahme der schnellen Kinetik der Chlorophyllfluoreszenz und die Berechnung der Fläche zwischen der Fm-Linie und der gemessenen Kurve wurde der Parameter  $A_{max}$  bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 33 zusammengefaßt.



**Abbildung 33: Veränderung des Parameter  $A_{\max}$  bei Kultivierung von *Nicotiana* in einer undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Salzlauge.**

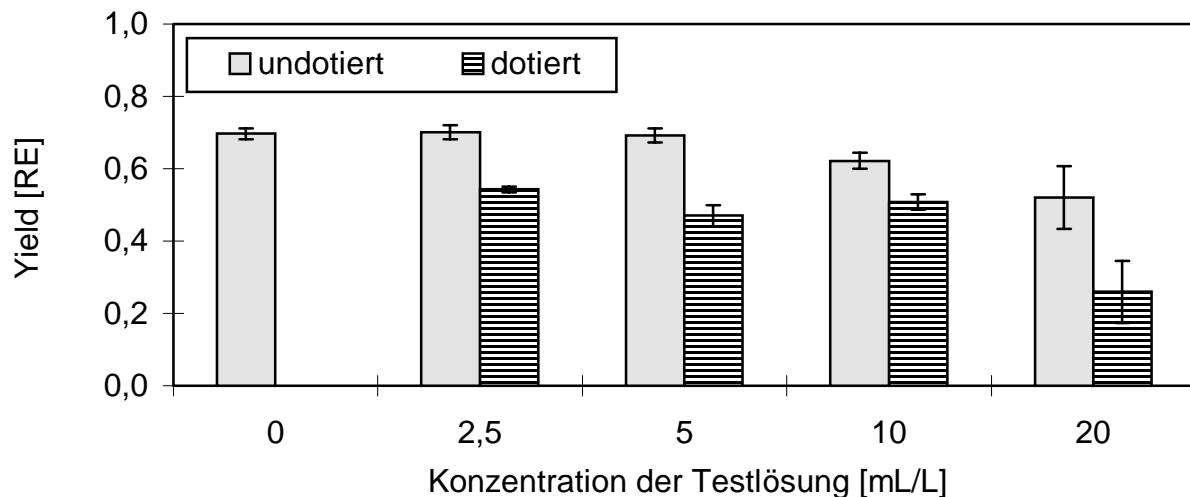
Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode durchgeführt. Angegeben sind die  $A_{\max}$ -Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

Die Größe von  $A_{\max}$  wurde durch den Einfluß der undotierten Salzlauge nicht verändert. Bei Kultivierung der Pflanzen in der dotierten Salzlauge verringerte sich  $A_{\max}$  allerdings stark. Dies bedeutet, daß durch die Wirkung der Schwermetalle in der dotierten Salzlauge viele Photosystem II Reaktionszentren zerstört wurden und damit  $A_{\max}$  verkleinerten.

$A_{\max}$  stellte daher eine geeignete Größe zur Bestimmung der toxischen Effekte von Schwermetallen in UTD-relevanten Abfalleluaten dar. Einen weiteren Vorteil bildete die Möglichkeit,  $A_{\max}$  von sehr vielen Blätter in kurzer Zeit zu messen, da die einzelne Messung nach der Dunkelinkubation nur ca. 3 Sekunden dauerte.

#### 3.3.1.4 Die Bestimmung der Meßgröße "Yield"

Die Ergebnisse der Messung des Parameters "Yield" sind in Abbildung 34 dargestellt.



**Abbildung 34: Wirkung der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung auf den Parameter “Yield” der Chlorophyllfluoreszenz von *Nicotiana* ohne zusätzlichen Lichtstreß.**

Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode unter Verwendung der Stufe 6 des aktinischen Lichtes durchgeführt. Es sind die “Yield“-Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen angegeben. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

RE: relative Einheiten

Wie bereits bei der Messung von Rfd nahm auch “Yield“ bei Erhöhung der Salzkonzentration stetig ab. Hier hatte demnach wiederum auch schon die reine Salzlösung IP21 einen negativen Einfluß. Der Effekt der dotierten Lösung war jedoch noch größer und führte zu einer so starken Reduzierung der Werte für “Yield“, daß sich die Wirkung der dotierten Lösung deutlich von der undotierten unterschied.

Auch die Messung des Parameters “Yield“ konnte daher für die Bestimmung der Toxizität von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten herangezogen werden. Diese Messung erforderte allerdings anders als die von  $A_{\max}$  und Fv/Fm einen relativ langen Zeitraum von mindestens 15 Minuten, in denen das Blatt mit aktinischem Licht bestrahlt wurde. Daher war diese Meßgröße für die Untersuchung großer Blattzahlen ungeeignet.

Obwohl Lichtenergie zu den wichtigen Faktoren der Photosynthese zählt und somit für das Überleben der autotrophen Pflanzen essentiell ist, kann Licht bei zu hohen Bestrahlungsintensitäten für Pflanzen einen Stressor darstellen. Zu starke Lichtstrahlung führt nicht nur zu einem Energieverlust dadurch, daß nicht mehr die gesamte eingestrahlte Energie im Rahmen der Photosynthese in chemische Energie umgewandelt werden kann. Vielmehr kommt es zur Bildung von reaktiven

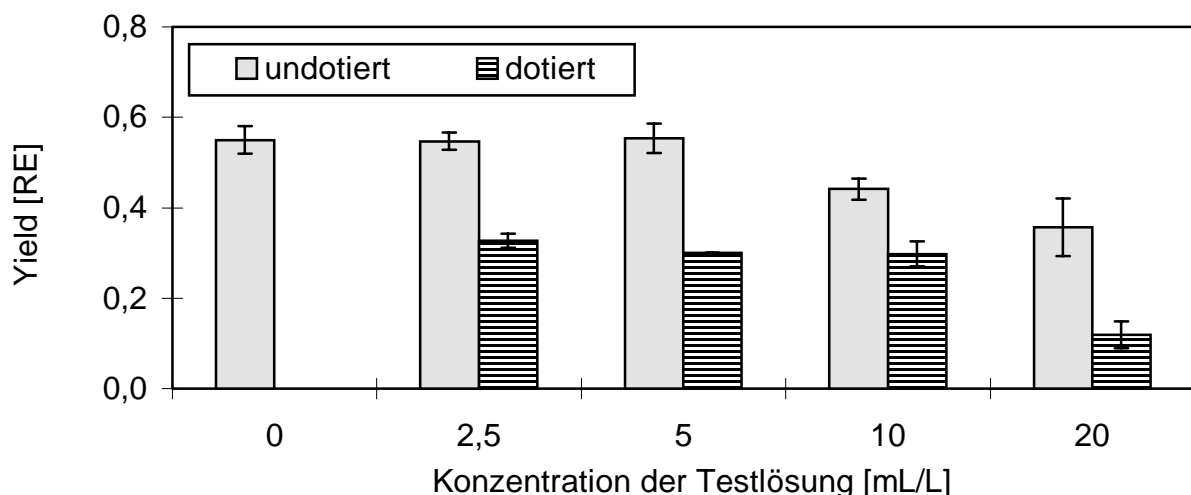


Sauerstoffradikalen, die ihrerseits Komponenten der Elektronentransportkette zerstören können. Somit wird ein Teil des Photosyntheseapparates nicht nur durch starke Lichtenergie gehemmt, sondern nachhaltig zerstört.

Es ist bekannt, daß Pflanzen, die bereits durch einen Stressor (z.B. Schwermetalle, Salz) geschädigt waren, durch einen zweiten stärker beeinträchtigt werden als ungestreßte Pflanzen (CHAPMAN et al. 1992; MOZAFAR und Oertli 1990, LARCHER et al. 1990; MISHRA et al. 1991). Daher ist es im Rahmen der Untersuchungen zur Wirkung der Abfalleluate auf *Nicotiana* wichtig, auch die Folgen der Salz/Schwermetall Belastung auf die Wirkung anderer Stressoren, wie z.B. Licht, zu betrachten.

Für die Messung des Parameters "Yield" mußten die Pflanzen mehrere Minuten mit Licht bestrahlt werden. Durch Beleuchtung der Pflanzen mit sowohl hohen Lichtintensitäten, die einen Lichtstreß auslösen, als auch niedrigeren, und anschließender Messung der Chlorophyllfluoreszenz konnte der Einfluß von zusätzlichem Streß (Lichtstreß) auf die Photosynthese bestimmt werden.

Die in Abbildung 34 gezeigten Messungen wurden mit einer Lichtintensität des aktinischen Lichtes von Stufe 6 ( $40 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) vorgenommen, die keinen Lichtstreß verursachten. In Abbildung 35 ist das Ergebnis der Messung an den gleichen Blättern, diesmal mit einer Lichtstreß induzierenden Beleuchtungsstärke von Stufe 10 ( $205 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) gezeigt.



**Abbildung 35: Einfluß der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung auf den Parameter "Yield" der Chlorophyllfluoreszenz von *Nicotiana* mit zusätzlichem Lichtstreß.**

Der Versuch unterscheidet sich von dem in Abbildung 34 dargestellten darin, daß "Yield" unter zusätzlichem Lichtstreß (aktinisches Licht Stufe 10 statt 6) aufgenommen wurde. Zur Durchführung und Fehlerlinien: Abbildung 34. RE: relative Einheiten

Der Wert "Yield" für die Kontrolle wurde durch die höhere Lichtintensität (Abbildung 35) verringert. Dies war zu erwarten, da bei einem Überangebot an Lichtquanten nicht der gleiche Anteil photochemisch genutzt werden konnte wie bei moderater Lichtstärke. Die effektive Quantenausbeute nahm daher mit steigender Lichtstärke ab, und "Yield" stellt eine Annäherung an diese effektive Quantenausbeute dar.

Wird die Wirkung des Lichtstresses auf die mit der dotierten IP21-Lösung behandelten Pflanzen betrachtet, so fällt auf, daß "Yield" hier in stärkerem Maße reduziert wurde als bei der Kontrolle oder den Pflanzen in der undotierten Lösung. Ohne Lichtstreß (Abbildung 34) verursachte die Kultivierung der Pflanzen in 5 bzw. 20 mL/L dotierter IP21-Lösung eine Verringerung des "Yield" auf 70 bzw. 50 % des Wertes, der Pflanzen in den jeweils gleichen Konzentrationen der undotierten Lösung. Erfolgte die Messung unter zusätzlichen Lichtstreßbedingungen (Abbildung 35), so erreichte der "Yield" der mit Schwermetallen dotierten Pflanzen nur noch 50 bzw. 30 % des Wertes der jeweiligen undotierten Pflanzen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß nur die mit Schwermetallen dotierte IP21-Lösung nicht aber die reine Salzlösung dazu führte, daß die Tabakpflanzen bei starker Lichtstrahlung noch zusätzliche Schädigungen durch Lichtstreß und Radikalbildung erlitt. Die Wirkung der Schwermetalle wurde durch einen weiteren Streßfaktor (Licht) verstärkt und konnte demnach noch zu stärkeren Schäden an den Pflanzen führen als in vielen anderen Ökotoxizitätstests unter Laborbedingungen detektiert wird.

### **3.3.2 Konzentration von Schwermetallen und anderen Elementen in *Nicotiana***

#### **3.3.2.1 Konzentration der zudotierten Schwermetalle**

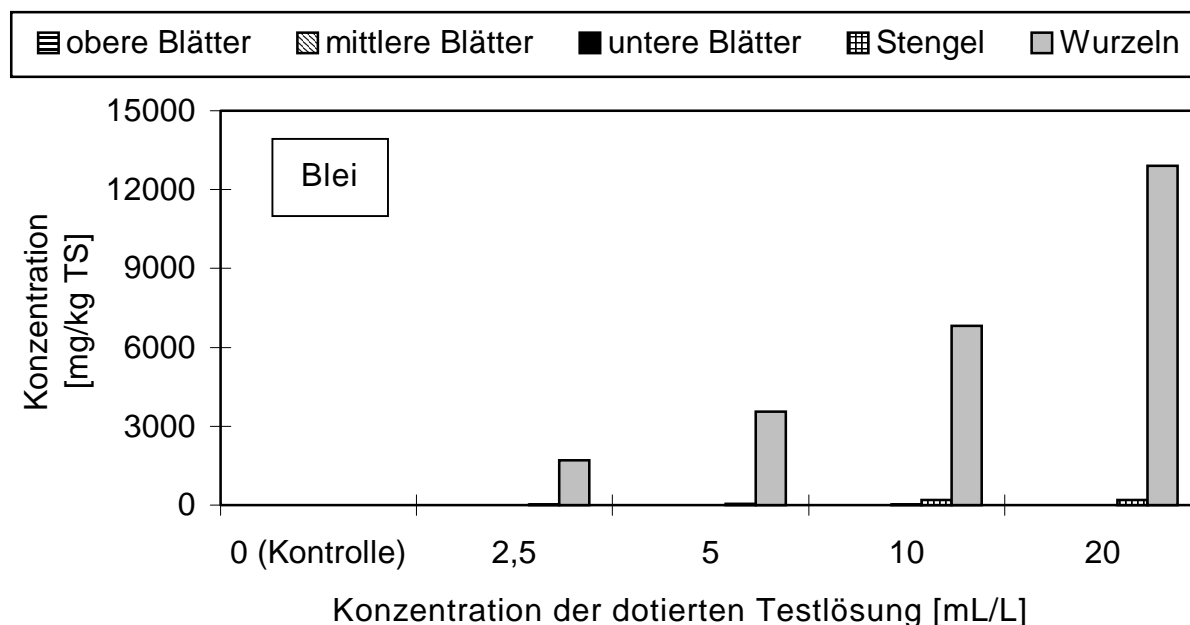
Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, daß mit dem *Nicotiana*-Fluoreszenztest die Wirkung der Schwermetalle in den Abfalleluaten detektiert werden kann. Allerdings liefert dies noch keine Informationen über die Ursache der Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates. Diese kann auf einer direkten Einwirkung der Schwermetalle auf die Photosynthese und/oder auf Schädigungen anderer physiologischer Stoffwechselvorgänge basieren. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob ein Transport der Schwermetalle der dotierten IP21-Lösung in die Blätter der Tabakpflanzen stattfand. Nur in diesem Fall ist die in den Abbildungen 31

bis 35 dargestellte Beeinträchtigung der Photosynthese bei schwermetallbelasteten Pflanzen auch auf eine direkte Schädigung der Blätter durch Schwermetalleinwirkung zurückzuführen. Wenn keine Schwermetalle in die Blätter gelangen, muß die Ursache der Schädigung des Photosyntheseapparates primär an einer anderen Stelle, z.B. der Wurzel, eintreten und sich erst sekundär auf die Photosynthese auswirken. Selbst bei hohen Schwermetallgehalten in den Blättern kann dies natürlich neben einem möglichen direkten Einfluß der Schwermetalle auf die Blätter nicht ausgeschlossen werden.

Die Tabakpflanzen, die für den Chlorophyllfluoreszenztest in Kapitel 3.3.1 einer undotierten bzw. einer mit Schwermetallen dotierten Salzlösung ausgesetzt waren, wurden für die Untersuchungen in ihre einzelnen Organe unterteilt. Anschließend wurde der Schwermetallgehalt der Organe getrennt voneinander bestimmt. (Die dotierte Salzlauge IP21 enthielt neben den Komponenten der undotierten noch die zugesetzten Schwermetalle Blei, Kupfer, Nickel, Cadmium und Zink, wobei Kupfer, Nickel und Zink als essentielle Elemente in sehr geringen Konzentrationen auch in der Nährlösung vorkamen.)

Durch entsprechende Bilanzierungen wurde ermittelt, welche Schwermetalle in welche Organe aufgenommen wurden. Aus dieser Lokalisation der Schwermetalle wurde geschlossen, welche Schwermetalle in welchen Organen zu einer direkten Schädigung führen konnten.

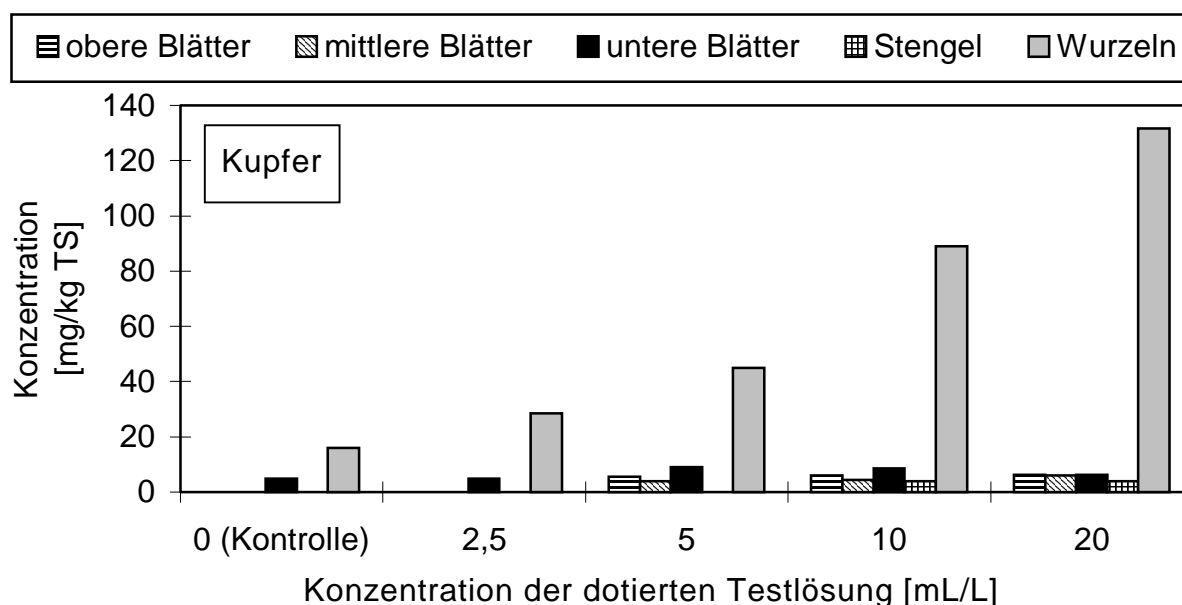
Die Ergebnisse der Analysen der Kupfer- und der Bleikonzentration in den Pflanzenorganen sind in den Abbildungen 36 und 37 wiedergegeben.



**Abbildung 36: Bleikonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**

Die Pflanzen wurden vier Wochen lang in einer Nährlösung (Kapitel 2.1.2) oder in mit Schwermetall dotierter IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3) kultiviert (Kapitel 2.3.6). Die Analyse der Bleikonzentration erfolgte gemäß der in Kapitel 2.5 beschriebenen Methode.

TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

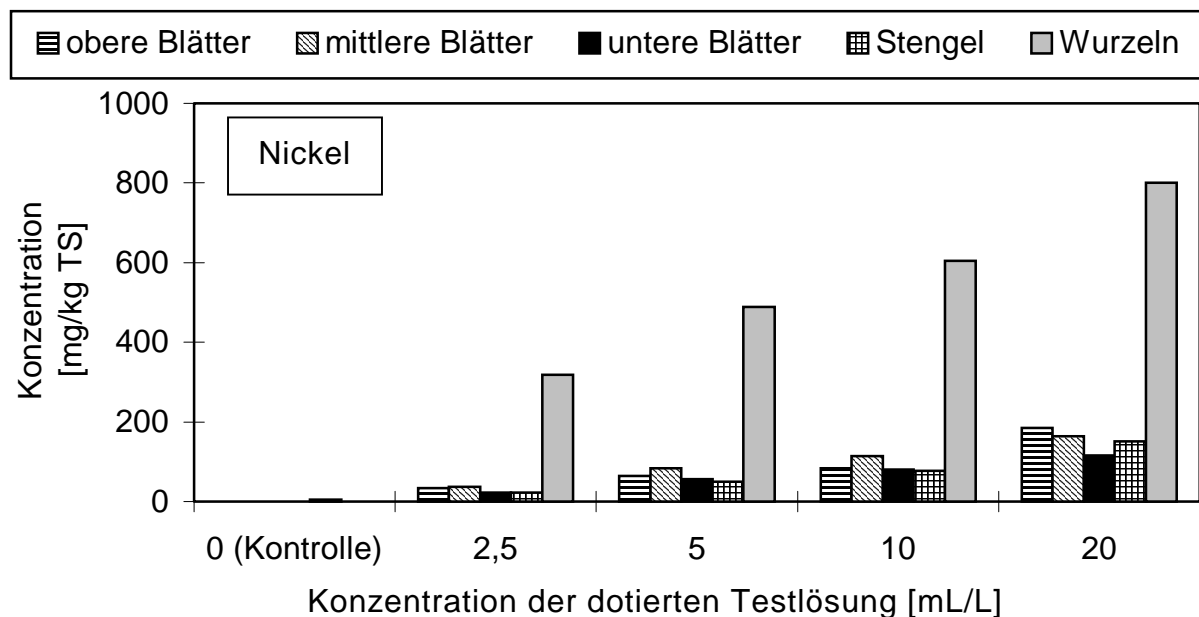


**Abbildung 37: Kupferkonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**

Die Analyse der Kupferkonzentration wurde nach der in Kapitel 2.5 beschriebenen Methode durchgeführt, nachdem die Pflanzen vier Wochen lang in einer Nährlösung (Kapitel 2.1.2) oder in mit Schwermetall dotierter IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3) kultiviert (Kapitel 2.3.6) worden sind.

TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

Die in den Abbildungen 36 und 37 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß Blei und Kupfer fast ausschließlich in den Wurzeln zurückgehalten wurden bzw. an ihnen adsorbierten. Ein geringer Kupfergehalt wurde jedoch auch in den Blättern nachgewiesen. Der Bleigehalt der Sprosse kann darauf zurückzuführen sein, daß sie während der Kultivierung wenige cm in die Nährlösung eingetaucht waren und das Blei durch Abspülen der Stengel mit Wasser nicht vollständig entfernt werden konnte.

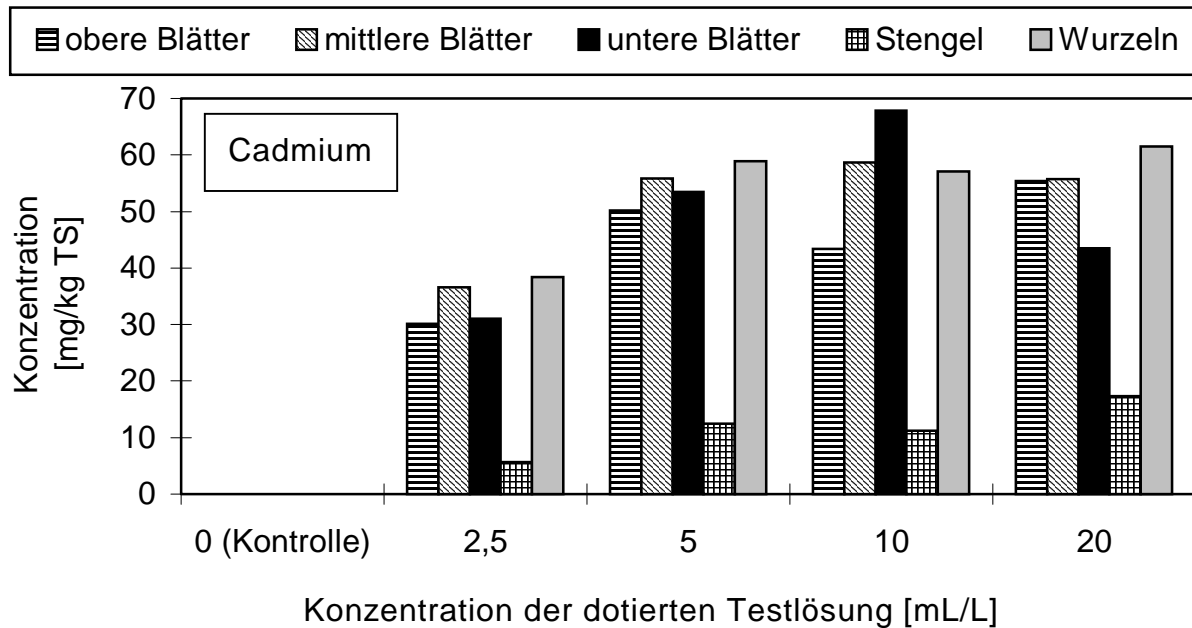


**Abbildung 38: Nickelkonzentration der unterschiedlichen Gewebe von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 37.

TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

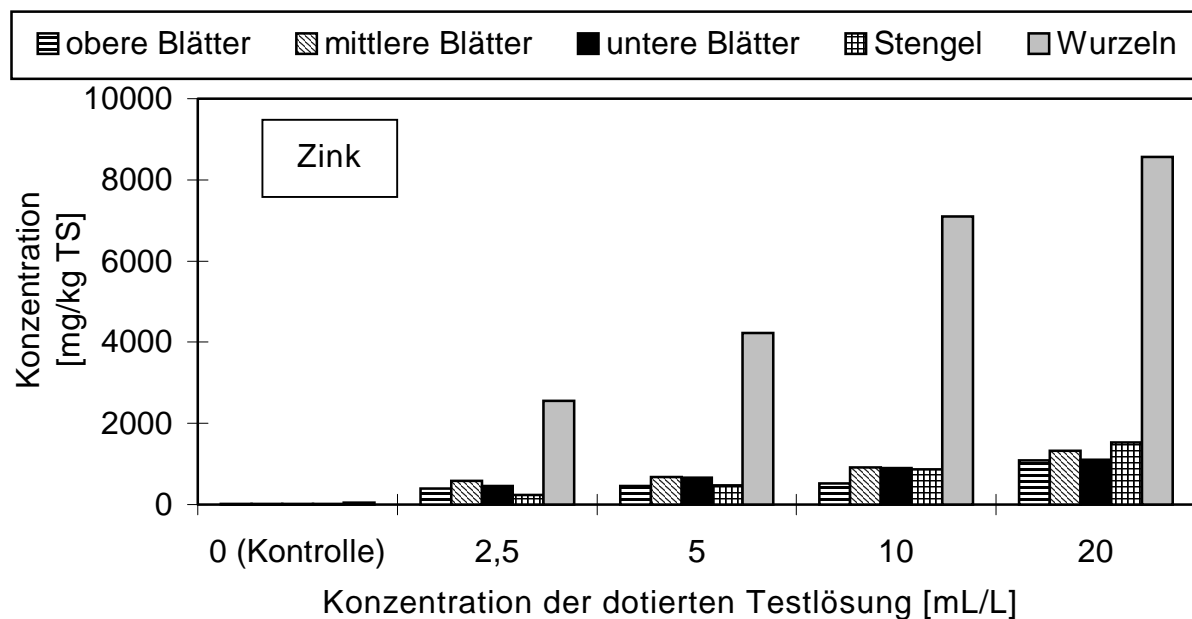
Nickel wurde in alle Pflanzenteile (Wurzel, Sproß und Blätter) aufgenommen (Abbildung 38). Die Konzentration im Gewebe stieg hierbei mit dem Gehalt in der Nährlösung an. Bei der Untersuchung der Blätter wurde bei allen Messungen in drei Blattetagen unterschieden - untere, mittlere und obere Blätter. Der Nickelgehalt war in den der Sproßspitze an nächsten inserierten Blättern am größten und nahm nach unten hin ab.



**Abbildung 39: Cd-Konzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 37. TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

Auch Cadmium wurde in die gesamte Pflanze transportiert (Abbildung 39). In den Wurzeln schien die Cd-Aufnahmekapazität bereits bei einer Konzentration der Nährlösung von 5 mL/L gesättigt zu sein. Dies galt auch für die mittleren und oberen Blätter. Auch ihr Cd-Gehalt blieb ab 5 mL/L relativ konstant. Lediglich der Cd-Gehalt der unteren Blätter stieg bis zur Nährlösungskonzentration von 10 mL/L an, um danach wieder deutlich abzusinken.



**Abbildung 40: Zinkkonzentration der unterschiedlichen Gewebe von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 37. TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

Zink wurde ebenfalls von den Wurzeln aufgenommen und anschließend in die gesamte Pflanze verlagert (Abbildung 40). Dabei stieg der Zinkgehalt in allen Pflanzenteilen proportional mit der Zinkkonzentration im Medium an. Bei einem Vergleich der drei unterschiedlichen Blattetagen wurde der höchste Zinkgehalt in den mittleren Blättern gemessen.

#### *Zusammenfassung der Ergebnisse der Schwermetallkonzentrationen in den Pflanzen*

Die Analyse der Schwermetallgehalte der Blätter zeigte, daß alle der zur IP21-Lösung dotierten Schwermetalle bis auf Blei in die Blätter aufgenommen wurden und dort eine direkte Schädigung der Chloroplasten verursachen könnten.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz ermöglicht es nicht nur, die Schädigungen des Photosyntheseapparates durch Einwirkung von toxischen Schwermetallen zu detektieren, sondern mit dieser sensiblen Meßmethode können darüber hinaus noch weitere Beeinträchtigungen des pflanzlichen Metabolismus, wie z.B. Trocken- und Salzstreß oder Nährstoffmangel, erfaßt werden. Dies bedeutet, daß die mit dem PAM-2000 ermittelten Effekte nicht allein auf der Wirkung der Schwermetalle in den Blättern beruhen müssen.

Dies wird auch dadurch deutlich, daß einige der gemessenen Parameter ("Yield" und Rfd) eine Störung der Photosynthese durch die undotierte IP21-Lösung anzeigten. Es mußte daher auch ohne Zusatz der Schwermetalle schon zu einer Schädigung durch den Salzgehalt der Lösung kommen.

Um Informationen über die möglichen Ursachen hierfür zu erhalten, wurden auch die Gehalte anderer für den pflanzlichen Metabolismus wichtigen Metalle in den Tabakpflanzen analysiert.

#### **3.3.2.2 Gehalte der Pflanzen an den Elementen, die in der IP21-Lösung in hohen Konzentrationen vorkommen (Mg, Na, S, K)**

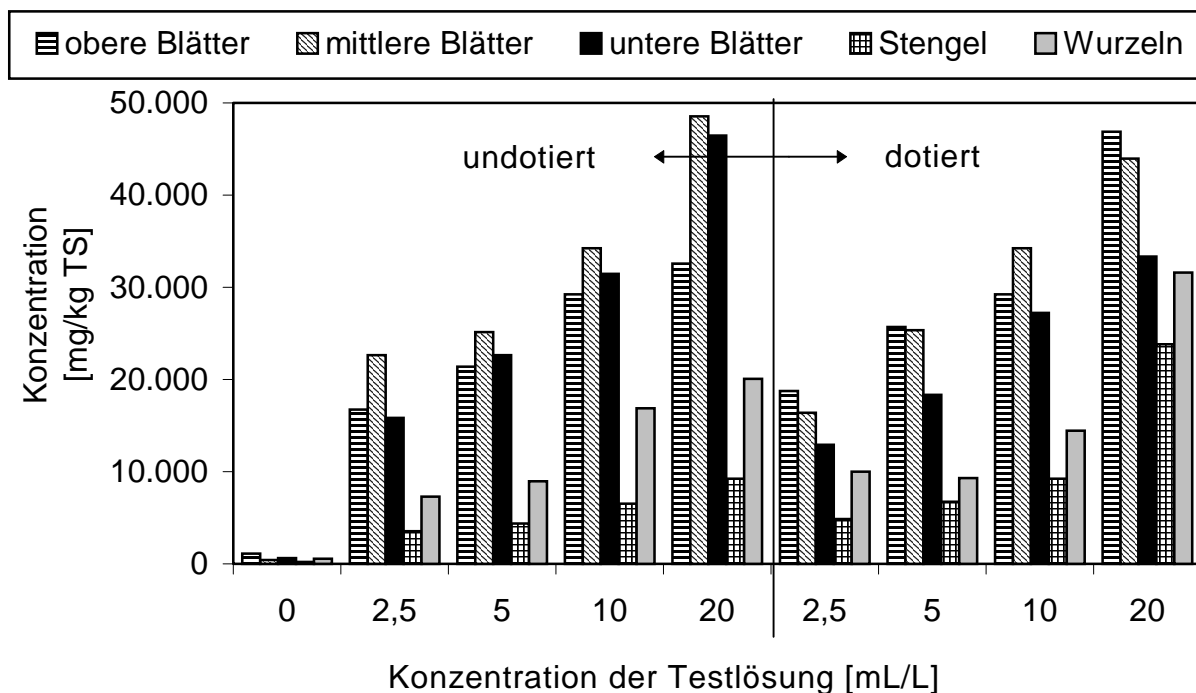
*Nicotiana tabacum* wurde in einem Nährmedium unter Zusatz je einer von zwei verschiedenen Testlösungen kultiviert, die beide einen etwa gleich großen, ausgesprochen hohen Salzgehalt aufwiesen, wobei die eine zusätzlich mit Schwermetallen dotiert war. Dabei bildeten Magnesium, Natrium, Schwefel und Kalium neben Chlorid die Hauptbestandteile der IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.1,

Tabelle 3). Diese Metalle gehören zu den Makroelementen und werden von den Pflanzen in relativ hohen Konzentrationen für ihre Stoffwechselreaktionen benötigt.

Da *Nicotiana* mit verschiedenen Konzentrationen dieser Testlösungen kultiviert wurde, waren die folgenden Auswirkungen auf den Gehalt dieser Elemente in den Pflanzen möglich:

1. Mit ansteigender Konzentration eines Elementes in der Hydrokulturlösung wurde die Aufnahme in die Pflanzen vergrößert und somit auch die Konzentration dieses Elementes im pflanzlichen Gewebe.
2. Mit ansteigender Konzentration eines Elementes in der Hydrokulturlösung blieb die Aufnahme in die Pflanzen konstant. Die Konzentration dieses Elementes im pflanzlichen Gewebe blieb unverändert.
3. Mit ansteigender Konzentration eines Elementes in der Hydrokulturlösung sank die Aufnahme in die Pflanzen und somit auch die Konzentration dieses Elementes im pflanzlichen Gewebe.

In Abbildung 41 ist der Gehalt der *Nicotiana*-Pflanzen an Magnesium dargestellt.



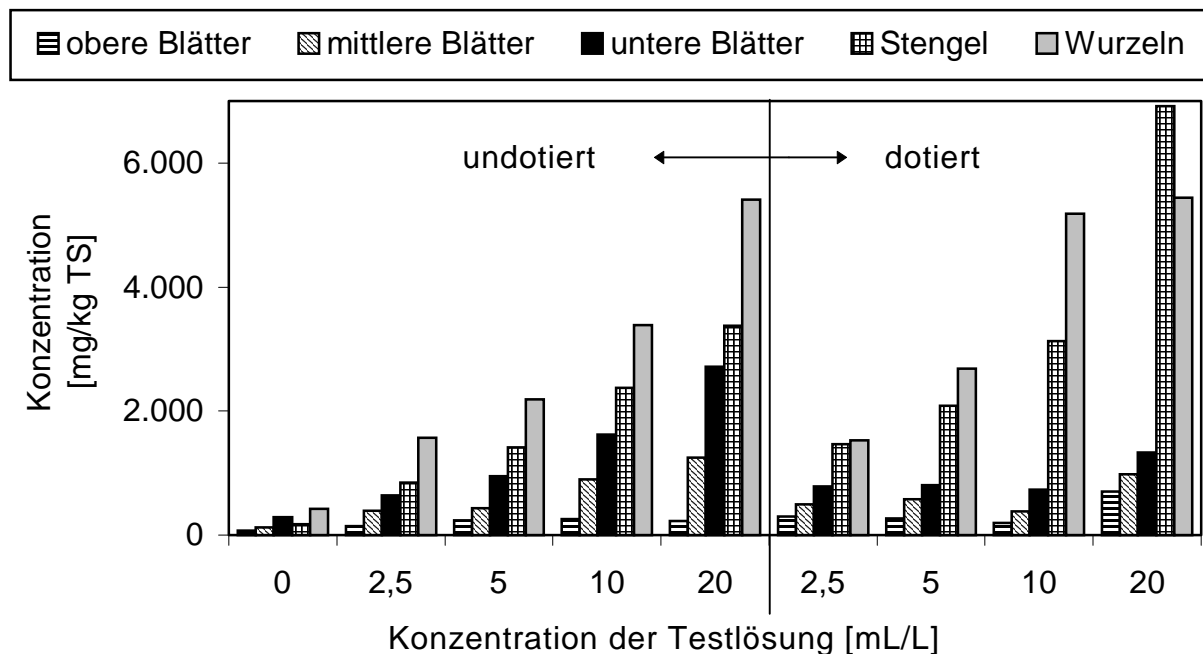
**Abbildung 41: Magnesiumkonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Nach einer vierwöchigen Kultivierung mit einer Welch-Nährlösung als Kontrolle und sowohl einer undotierten (Kapitel 2.2.2.1) als auch einer mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3) erfolgte eine Analyse der Magnesiumkonzentration wie in Kapitel 2.5 beschrieben.



Mit steigender Magnesiumkonzentration in den Hydrokulturlösungen stieg auch der Gehalt dieses Elementes in allen Pflanzenorganen an. Dabei wurden die höchsten Konzentrationen in den Blättern erreicht.

Bei einer Konzentration der IP21-Lösung von 20 mL/L waren in dieser Lösung 1.914 mg/L Mg enthalten. Hätte sich in den Blättern die gleiche Konzentration wie im Medium eingestellt, so müßte hier eine Mg-Konzentration von ca. 1.914 mg/kg FG bzw. 19.140 mg/kg TS vorhanden gewesen sein. In den Analysen wurden jedoch ca. 32.000 bis 49.000 mg/kg TS Magnesium detektiert. Dies bedeutet, daß Magnesium in den Blättern der Tabakpflanzen zumindest bei höheren Konzentrationen der Testlösung akkumuliert wurde.

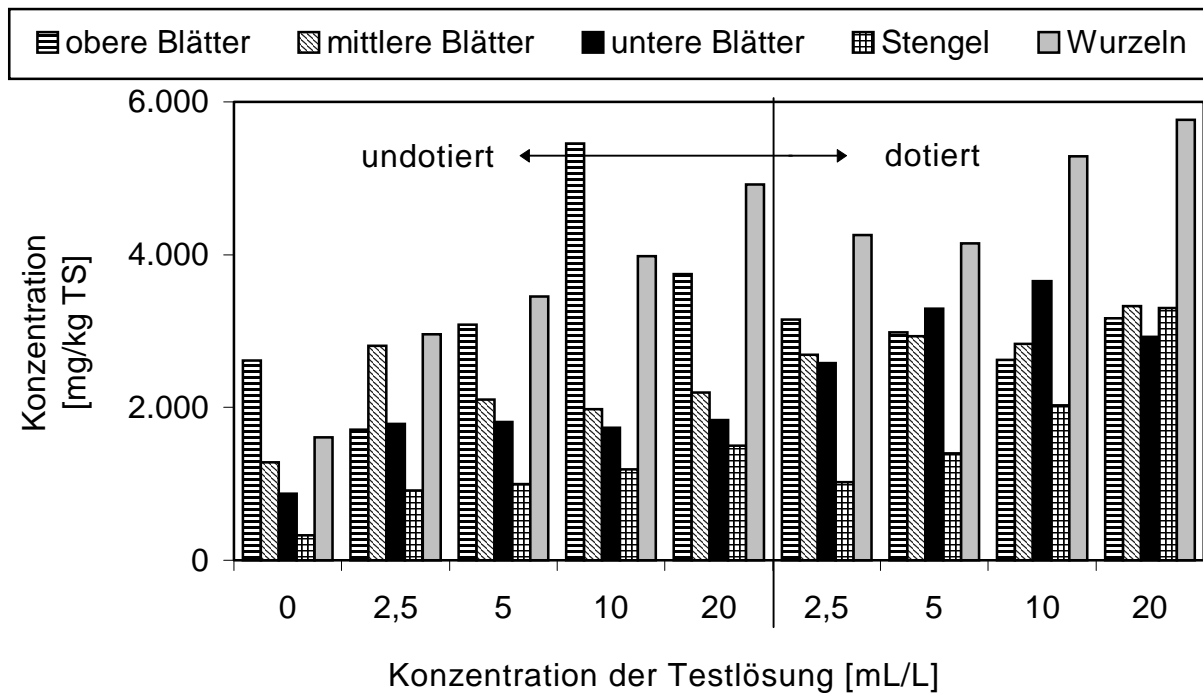


**Abbildung 42: Natriumkonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

Auch die Natriumkonzentration der einzelnen Pflanzenorgane nahm mit steigender Konzentration der Testlösung zu (Abbildung 42). Im Gegensatz zu Magnesium wurden die höchsten Konzentrationen in den Wurzeln gefunden. (Mit Ausnahme von 20 mL/L dotierte IP21-Lösung. Hier überwog die Konzentration in den Stengeln.) Der Natriumgehalt sank dann kontinuierlich über die Stengel bis hin zu den Blättern an der Sproßspitze.

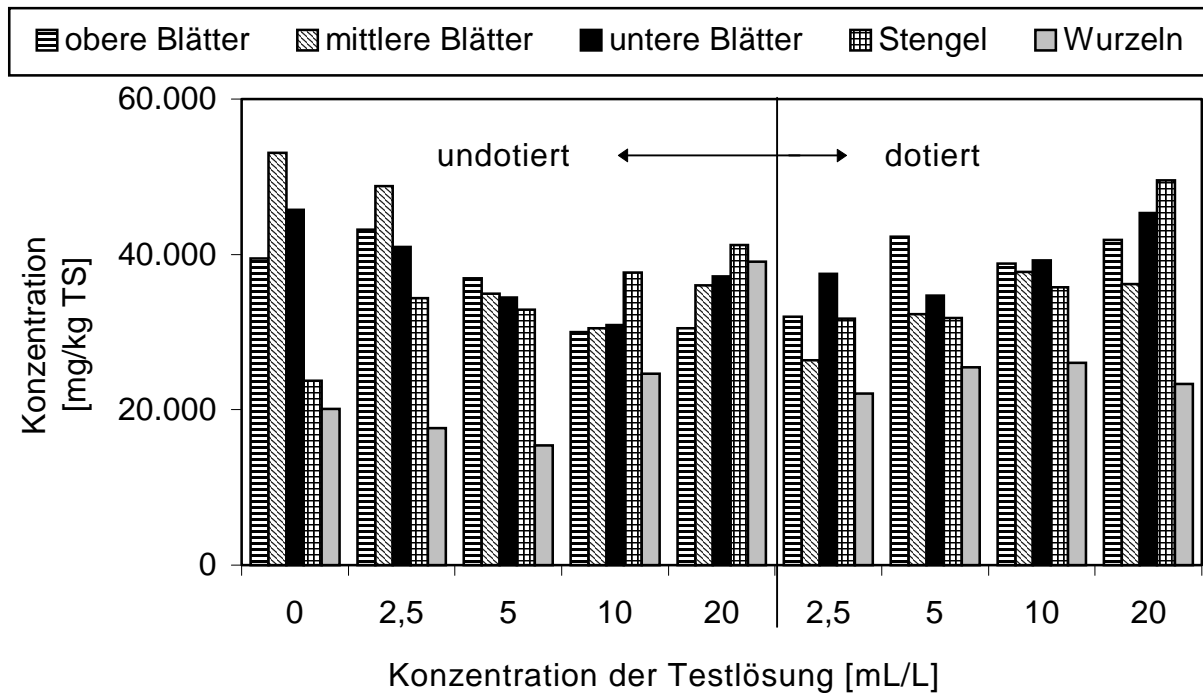
Im Falle einer Konzentration der IP21-Lösung von 20 mL/L wären ohne Akkumulation ca. 180 mg/kg FG bzw. 1.800 mg/kg TS Natrium in den Blättern zu erwarten gewesen. In den Blättern nachgewiesen wurde ein Natriumgehalt von <1.000 bis 3.000 mg/kg TS. Diese Daten zeigen, daß Natrium nicht in den Blättern akkumuliert wurde. Auch bei einem Gehalt von 300 mg/kg FG bzw. 3000 mg/kg TS kann von keiner eindeutigen Ansammlung gesprochen werden.



**Abbildung 43: Schwefelkonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

Die Schwefelkonzentration nahm mit steigender Dosierung in der Testlösung in allen Organen zu (Abbildung 43). Allerdings war diese Beziehung bei den Blättern nicht immer eindeutig. In fast allen Fällen wurde die höchste Schwefelkonzentration in den Wurzeln gefunden, d.h., daß dieses Element hauptsächlich in den Wurzeln zurückgehalten wurde.



**Abbildung 44: Kaliumkonzentration in den Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

Die Kaliumkonzentrationen in den Pflanzen, die mit der undotierten IP21-Lösung kultiviert wurden, sanken anfänglich bei steigender Dosierung dieser Salzlösung (Abbildung 44). Ab einem Zusatz von 10 bzw. 20 mL/L der undotierten IP21-Lösung stiegen die Kaliumkonzentrationen der Gewebe jedoch wieder an. Dennoch blieb die Kaliumkonzentration in den Blättern unterhalb derjenigen der Blätter der Kontrolle.

Die Kultivierung mit nur 2,5 mL/L der dotierten IP21-Lösung führte verglichen mit der Kontrolle zwar zu einer Abnahme der Kaliumkonzentration in den Blättern, bei höherem Anteil der dotierten IP21-Lösung in der Hydrokulturlösung (5 bis 20 mL/L) stieg die Kaliumkonzentration in den Pflanzen doch wieder bis etwa auf das Niveau der Kontrolle oder darüber an.

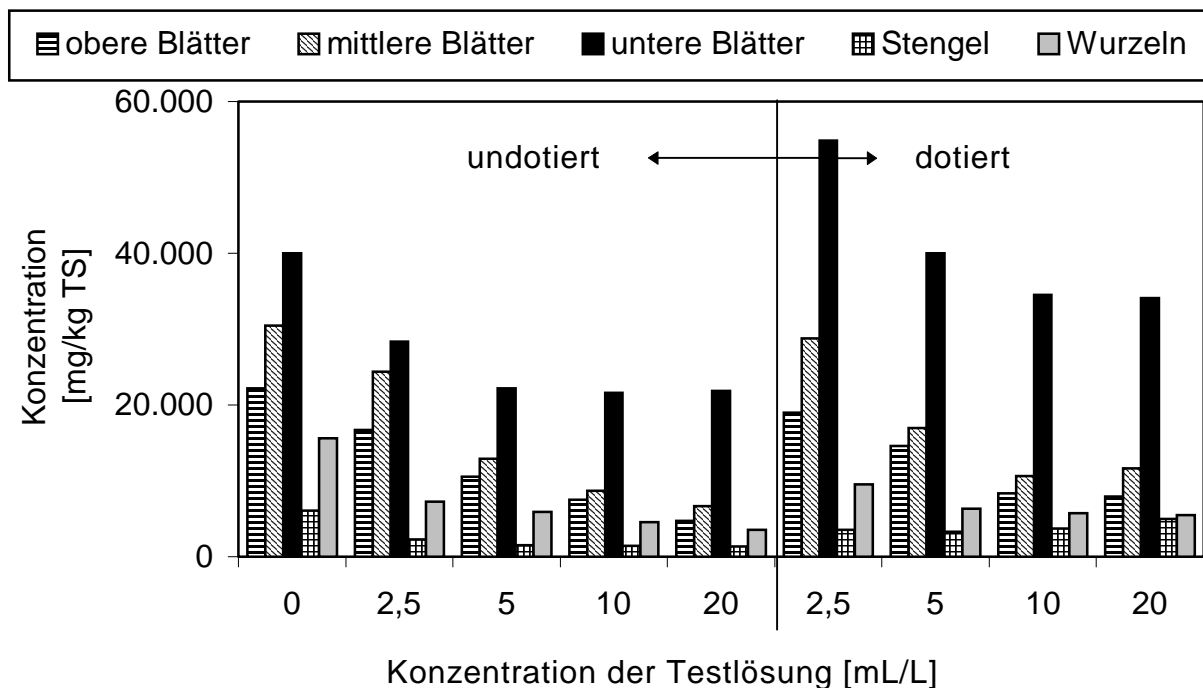
*Zusammenfassung: Konzentrationen der Hauptbestandteile der IP21-Lösung in den Pflanzen*

Von den oben aufgezeigten drei Alternativen (Aufnahme vergrößert sich, verringert sich oder bleibt gleich) bestätigte sich für die Betrachtung von Magnesium, Natrium und Schwefel Punkt eins. Mit Zunahme der Salzkonzentration im Hydrokulturmedium stieg auch der Elementgehalt in der Pflanze an. Dies wurde durch eine zusätzliche Schwermetalldotierung der Salzlösung nicht beeinflusst.

### 3.3.2.3 Konzentration von Elementen, die nicht, oder nur in geringen Mengen in der IP21-Lösung enthalten sind (Ca, B, Mn, Mo)

Die Aufnahme von Elementen, die nicht oder nur in sehr geringen Dosen in der zugesetzten Salzlösung vorkommen, aber einen Bestandteil des Hydrokulturmediums darstellen, kann durch Stimulierung oder Hemmungsmechanismen ebenfalls verändert werden (REINBOTT und BLEVINS 1991; BANSAL und CHAHAL 1990). Da diese Elemente auch eine wichtige Rolle in der Pflanzenernährung spielen, wurde ihr Gehalt in den Tabakpflanzen ebenfalls bestimmt.

In Abbildung 45 sind die Ergebnisse der Calciumanalysen der Tabakpflanzen wiedergegeben.



**Abbildung 45: Calciumkonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

Calcium ist ein wichtiges Makroelement, das den kolloidalen Quellungszustand des Plasmas beeinflusst. Es ist Bestandteil der Pektine in der Zellwand und spielt eine wichtige Rolle bei der funktionellen und strukturellen Integrität der Biomembranen. Demzufolge ist es auch in der Nährlösung in hoher Konzentration enthalten. Ca

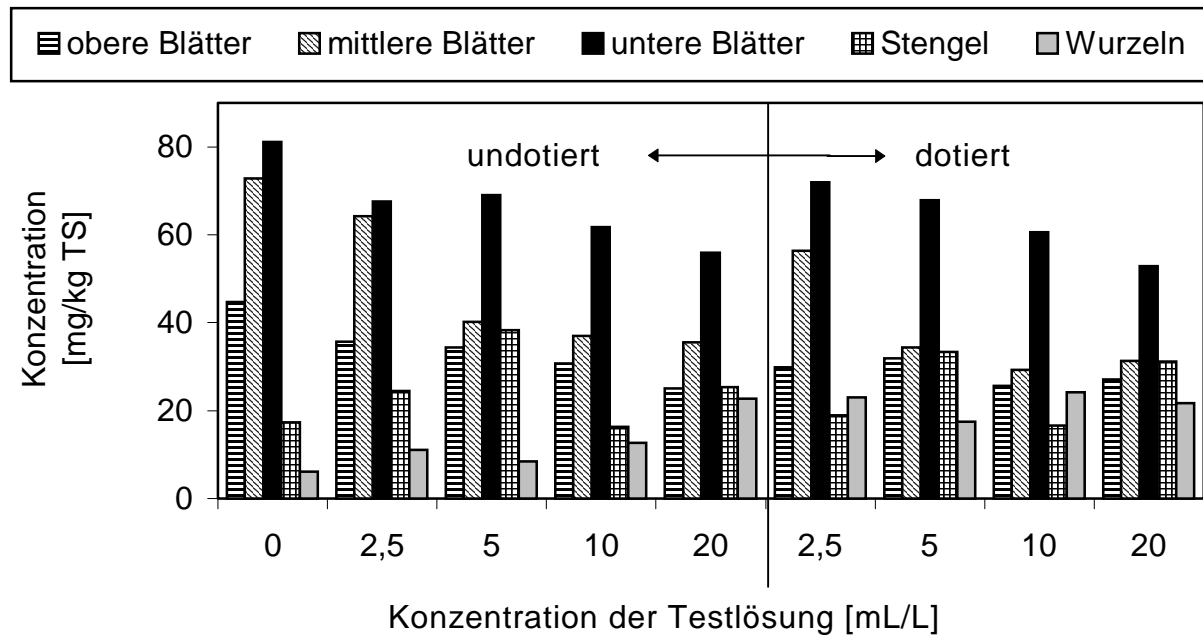
kommt jedoch auch in geringen Mengen in der undotierten und der dotierten IP21-Lösung vor (Kapitel 2.2.2.1 bzw. 2.2.2.3).

Die Analysenergebnisse zeigen, daß Calcium in allen Pflanzenteilen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 45). Allerdings waren die Ca-Konzentrationen in den Wurzeln bereits bei einem Zusatz von 2,5 mL/L sowohl undotierter als auch dotierter Lösung gegenüber der Kontrolle deutlich reduziert, obwohl mit dem Zusatz der IP21-Lösung die Ca-Konzentration der Nährlösung vergrößert worden war. Mit noch größerem Anteil an undotierter oder dotierter IP21-Lösung nahm die Ca-Konzentration der Wurzeln weiter ab.

Auch die Ca-Konzentration in den Stengeln und den oberen und mittleren Blättern wurde durch Zugabe sowohl undotierter als auch dotierter IP21-Lösung auf einen Wert unterhalb der Kontrolle reduziert. Lediglich die untersten Blätter der Pflanzen in der am niedrigsten dotierten Nährlösung (2,5 mL/L dotierte IP21-Lösung) wiesen erheblich gesteigerte Ca-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle auf. Eine Erhöhung der Konzentration der dotierten IP21-Lösung führte jedoch auch in den Blättern zu sinkenden Ca-Konzentrationen.

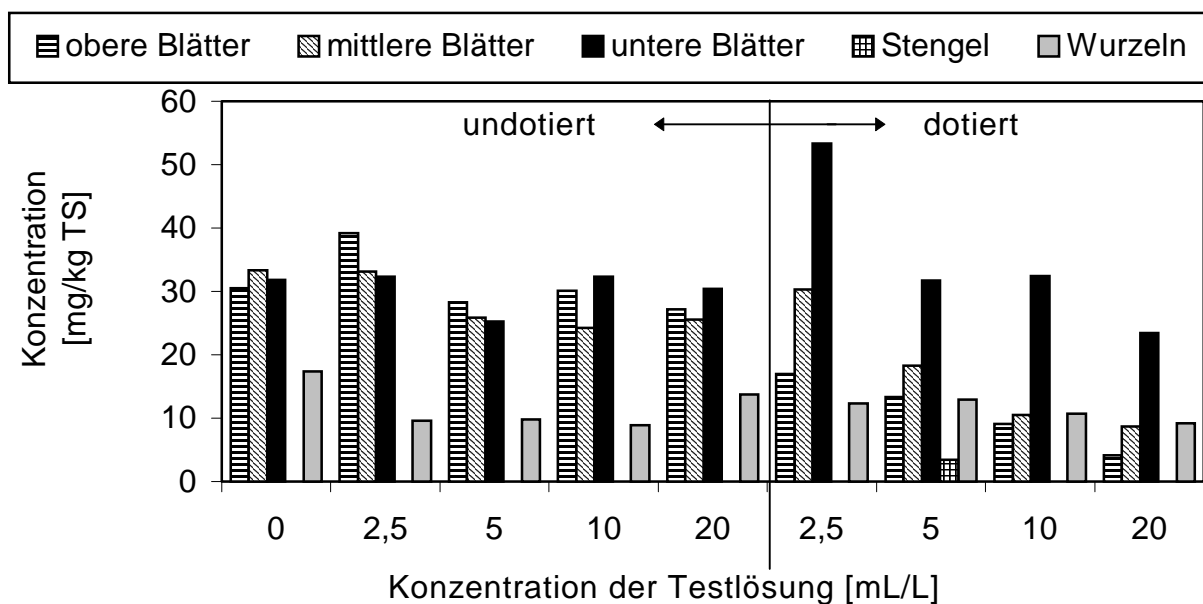
Essentiell für das Überleben der Pflanzen sind neben den Makroelementen die sogenannten Mikroelemente, zu denen Bor, Mangan und Molybdän gehören. Trotz der nur äußerst geringen Mengen dieser Elemente, die von den Pflanzen benötigt werden, führt der Mangel nur eines Mikroelementes bereits zu schweren Stoffwechselstörungen. Der Mangel von Mangan und Molybdän kann z.B. zu Blattchlorosen führen (MOHR und SCHOPFER 1992). Bei Bormangel kann es zum Absterben der Sproßspitzen kommen (MOHR und SCHOPFER 1992).

Die Konzentrationen der oben genannten Mikroelemente wurden in den einzelnen Organen von *Nicotiana* analysiert.



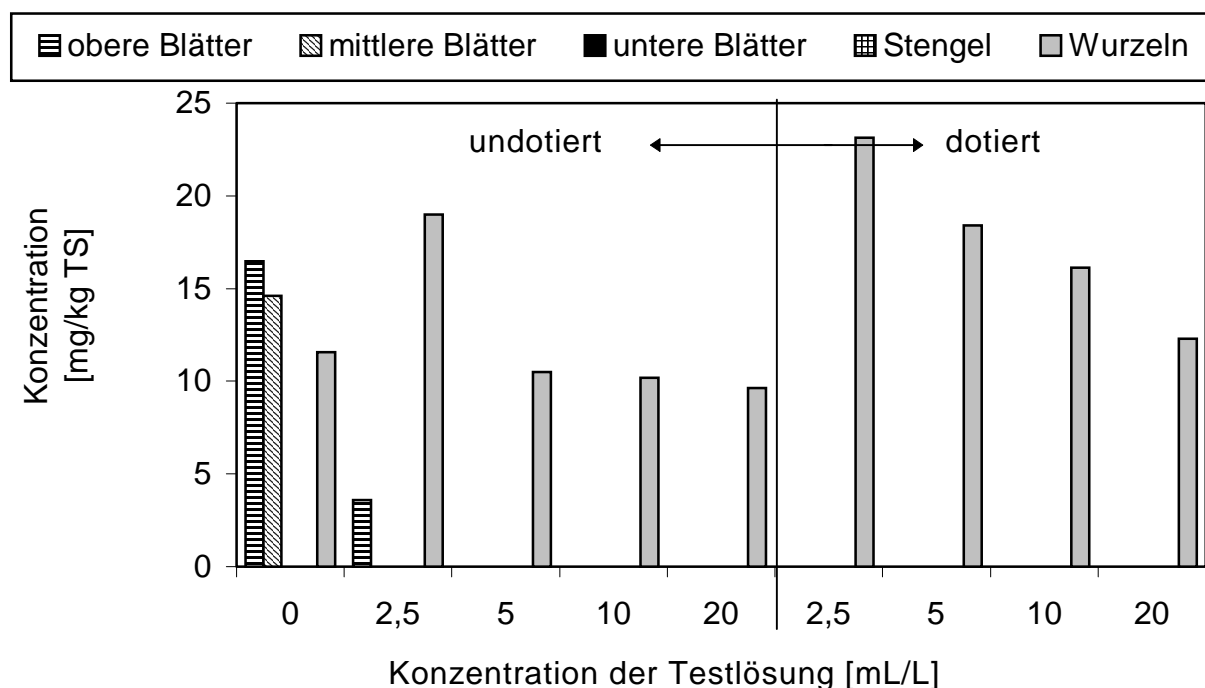
**Abbildung 46: Borkonzentration in den unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**  
Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

Die Kultivierung der Tabakpflanzen in den beiden Testlösungen führte zum Anstieg der Borkonzentration sowohl in Wurzeln als auch in Stengeln (Abbildung 46). Der Gehalt in den Blättern nahm hingegen mit steigender Konzentration der Testlösung ab. Die zusätzliche Dotierung mit Schwermetallen hatte keinen Einfluß auf dieses Ergebnis.



**Abbildung 47: Mangankonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana*.**  
Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41. Bestimmungsgrenze: < 5 mg/kg TS.

Durch Kultivierung von *Nicotiana* in den zwei verschiedenen Testlösungen nahm die Mangankonzentration in Wurzeln und Blättern ab (Abbildung 47). Einzige Ausnahme hiervon bildeten die Blätter der Pflanzen in der niedrigsten Konzentration der Testlösung (2,5 mL/L), deren Mangangehalt leicht anstieg. Höhere Dosen der Testlösungen bewirkten jedoch auch bei diesen Blättern eine Abnahme der Mangankonzentration unter das Niveau der Kontrolle. Dabei verursachte die mit Schwermetallen dotierte IP21-Lösung einen stärkeren Rückgang der Mangankonzentration als die undotierte. Aufgrund der hohen analytischen Nachweisgrenze konnte in den Stengeln kein Mangan nachgewiesen werden.



**Abbildung 48: Molybdänkonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41. Bestimmungsgrenze: < 5 mg/kg TS.

Die Molybdänkonzentration in den Blättern nahm mit Kultivierung der Pflanzen in den Testlösungen sehr stark ab (Abbildung 48). Dieser Rückgang konnte nicht genauer bilanziert werden, da die Werte mit nur einer Ausnahme unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Aus dem gleichen Grund konnte auch der Molybdängehalt der Stengel, selbst der der Kontrolle, nicht quantifiziert werden.

Die Molybdänkonzentration in den Wurzeln stieg durch geringe Dosen der Testlösungen an, während er bei höherer Belastung der Pflanzen mit Testlösungen wieder auf etwa den Ausgangswert der Kontrolle absank.

#### *Zusammenfassung der Analyseergebnisse der Gehalte von Calcium und der Mikroelemente Bor, Mangan und Molybdän*

Die Metalle Calcium, Bor, Mangan und Molybdän kamen nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen in der IP21-Lösung vor. Sie waren jedoch alle im Hydrokulturmedium enthalten. Eine Kultivierung der Tabakpflanzen sowohl mit der undotierten als auch mit der dotierten IP21-Lösung führte zu einer Abnahme der Konzentrationen dieser Nährstoffe in nahezu allen untersuchten Organen (Wurzeln, Stengel und Blätter).

#### **3.3.2.4 Schlußfolgerung**

Die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz wiesen eine starke Beeinträchtigung der Photosynthese der Tabakpflanzen durch die dotierte IP21-Lösung nach. Doch auch die undotierte Salzlösung hemmte die Photosynthese. Der Vergleich der oben vorgestellten Verteilung von sowohl toxischen Schwermetallen als auch essentiellen Nährstoffen in den Versuchspflanzen mit den Daten der Fluoreszenzmessung erlaubt folgende Schlußfolgerungen über mögliche Ursachen der Schädigung:

1. Die Schwermetalle, die bis in die Blätter aufgenommen wurden (Kupfer, Nickel, Cadmium und Zink), bewirkten eine direkte Schädigung der Chloroplasten. Allerdings war dies im Falle der Kultivierung in undotierter IP21-Lösung ausgeschlossen.
2. Bestandteile der undotierten IP21-Lösung, deren Konzentration in den Blättern stark zunimmt (z.B. Natrium) schädigten direkt die Chloroplasten.
3. Schwermetalle und/oder Bestandteile der undotierten IP21-Lösung schränkten durch Beeinträchtigung der Wurzeln oder Hemmung der Aufnahmemechanismen eine Versorgung der Pflanzen mit Wasser und Nährstoffe ein. Die Hemmung der Photosynthese wurde durch einen Wasserstreß oder durch Unterversorgung mit Calcium, Bor, Mangan und/oder Molybdän hervorgerufen.

Ob die beobachteten Beeinträchtigungen der Photosynthese auf nur eines dieser Vorgänge oder auf eine Kombination aus mehreren zurückzuführen waren, konnte



mit den bisherigen Ergebnissen nicht geklärt werden. Es wurden daher weitere, im folgenden Kapiteln dargestellte, Experimente durchgeführt, um zu umfangreicheren Erkenntnissen über die Ursachen der beobachteten Effekte zu gelangen.

### **3.3.3 Wirkung von Salz- und Schwermetallstreß auf *Nicotiana* über eine gesamte Vegetationsperiode hinweg**

Die in den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.2 vorgestellten Versuche wurden an Pflanzen durchgeführt, die in Nährlösung nach WELCH et al. (1993) unter Zusatz einer IP21-Salzlösung (Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3) oder einer mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5) kultiviert wurden. Diese Testlösungen führen zu einer Beeinträchtigung der Photosynthese der Tabakpflanzen (Kapitel 3.3.1). Mit den folgenden Experimenten wurden die Ursachen für diese Beeinträchtigungen näher untersucht. Hierzu wurde das System vereinfacht, indem die Pflanzen unter Zugabe von mit Schwermetallen dotiertem aqua dest. (Kapitel 2.2.2.4) kultiviert wurden. Diese Schwermetall-Lösung (dotiertes aqua dest.) entsprach in der Schwermetallzusammensetzung und -konzentration der dotierten IP21-Lösung, sie enthielt jedoch nicht die Salzfracht der IP21-Lösung. Somit konnte die Wirkung des Faktors Salz ausgeschlossen werden, und Schädigungen würden allein auf einem Schwermetalleffekt basieren.

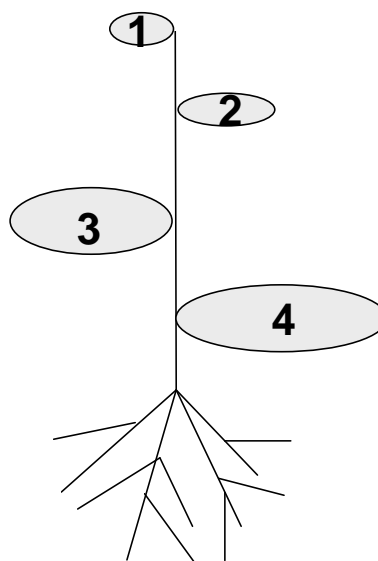
Neben dieser salzfreien Schwermetall-Lösung (dotiertes aqua dest.) wurden die Pflanzen in den bereits verwendeten beiden Testlösungen, reine IP21-Salzlösung und mit Schwermetallen dotierte IP21-Salzlösung, kultiviert.

Durch die Kultivierung der Pflanzen in diesen drei unterschiedlichen Testlösungen konnte zum einen die Wirkung der Schwermetalle von derjenigen der Salzlösung besser unterschieden werden. Zum anderen wurde eine Differenzierung der Wirkung des multiplen Stresses Salz plus Schwermetall vom Effekt des einfachen Stresses Salz oder Schwermetall erreicht.

Somit ermöglichte dieser Versuchsansatz es, weitere Hinweise über die Ursachen der mittels der Chlorophyllfluoreszenz in Kapitel 3.3.1 detektierten Beeinträchtigungen zu erhalten.

In Kapitel 3.3.1 wurde die Chlorophyllfluoreszenz nur jeweils eines Blattes pro Pflanze bestimmt, um die Eignung dieser Meßmethode für einen Phytotoxizitätstest zu verifizieren. Die Chlorophyllfluoreszenz aller anderen Blätter wurde nicht weiter berücksichtigt. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz aller Blätter einer Pflanze

über ihren gesamten Vegetationszyklus erlaubte jedoch Rückschlüsse auf die Langzeiteffekte der Schwermetalle und der Salze. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Chlorophyllfluoreszenz jedes Blattes einer Pflanze über einen Zeitraum von 14 Wochen erfaßt. Da *Nicotiana tabacum* mit einem orthotrophen Stengel wächst, konnten die spiraling um den Sproß wachsenden Blätter einer eindeutigen Insertionsnummer zugeordnet werden. Dabei bekam das jüngste Blatt an der Sproßspitze die Insertionsnummer eins, während das unterste und zugleich älteste Blatt die höchste Insertionsnummer erhielt (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Schematische Darstellung einer Tabakpflanze.**  
Die Zahlen geben die Blatinserptionsnummern an.

Aufgrund der großen Zahl der durchzuführenden Messungen war es nur möglich solche Parameter zu verwenden, die sich in jeweils wenigen Sekunden pro Blatt aufnehmen ließen. Aus diesem Grund wurden nur die Meßgrößen  $F_v/F_m$  und  $A_{max}$  nicht aber "Yield" und Rfd erfaßt.

Die Konzentrationen der Testlösungen in der Nährlösung wurden im folgenden Experiment so gewählt, daß die Pflanzen möglichst nicht bereits vor Ablauf der 14 Wochen abstarben. Aus diesem Grund wurden geringere Konzentrationen der Testlösungen verwendet als im vierwöchigen Ökotoxizitätstest (Kapitel 3.3.1), nämlich 0,5 - 1 - 2,5 und 5 mL/L statt 2,5 - 5 - 10 - 20 mL/L.

Da der Schwerpunkt der Auswertung auf dem zeitlichen Ablauf der Schädigung der unterschiedlichen Blattetagen lag, wurden nur die Mittelwerte der Ergebnisse und die relativen Kurvenverläufe betrachtet.

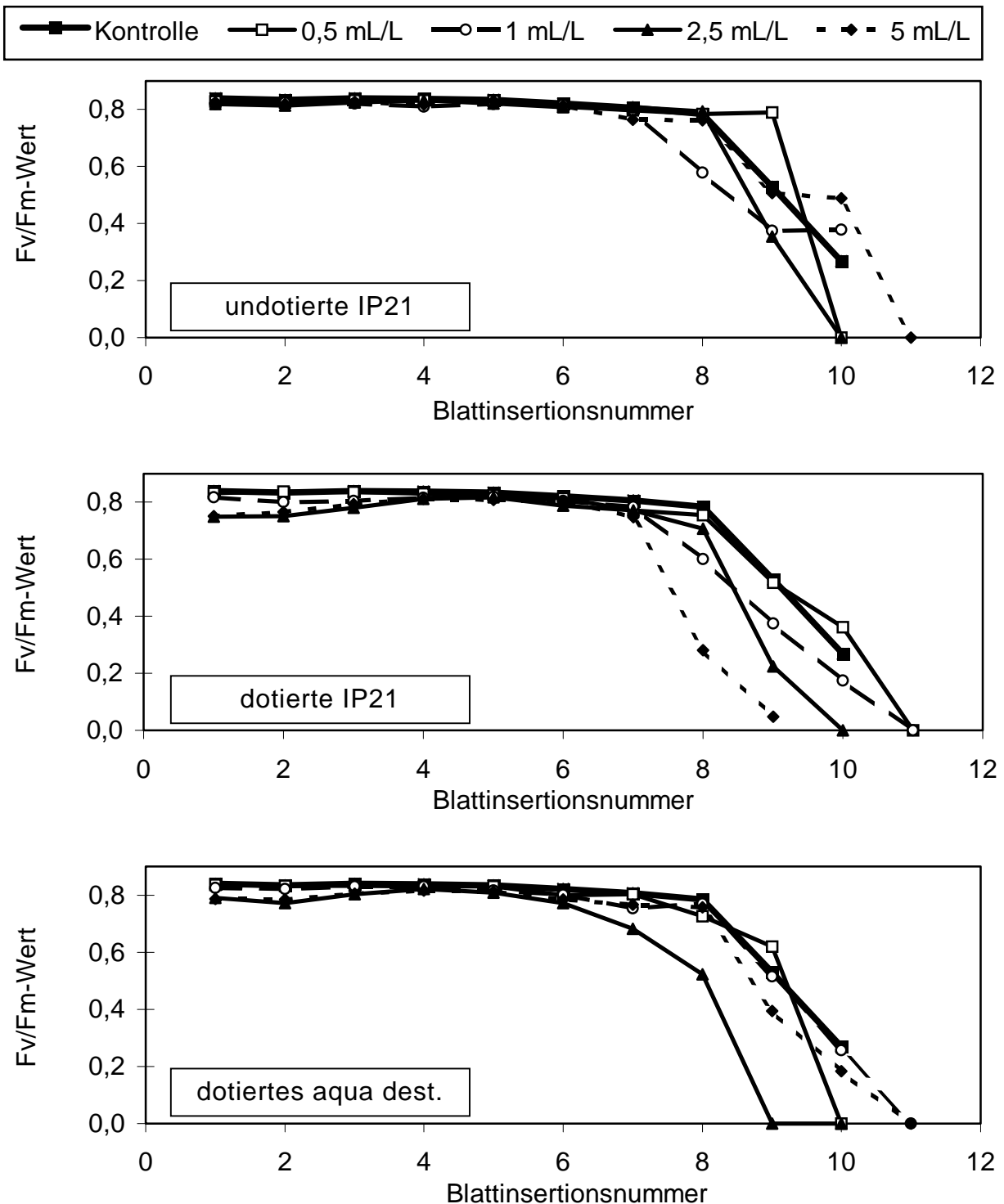
Aus diesem Grund wurde in den Grafiken auf die Eintragung der durch die natürliche Variabilität der Tabakpflanzen relativ großen Standardabweichungen verzichtet.

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Testlösungen auf die Pflanzen quantitativ bewerten zu können, war es notwendig die unterschiedlichen Auswirkungen der einzelnen Lösungen statistisch zu überprüfen. Die in Kapitel 3.3.3.2 dargestellten Daten wurden daher einem ANOVA-Test unterzogen.

### **3.3.3.1 Beeinflussung der Chlorophyllfluoreszenz der unterschiedlichen Blattetagen**

Die Woche 0 repräsentiert den Zeitraum, in dem noch alle Pflanzen in reiner Nährlösung wuchsen. Die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz zu dieser Zeit ergaben für alle Pflanzen erwartungsgemäß das gleiche Resultat. Der Vitalitätsindex  $F_v/F_m$  war über alle Blattetagen hinweg mit einem Wert von über 0,8 nahezu konstant. Der Parameter  $A_{\max}$  hingegen zeigte zwischen den Blattetagen bereits deutliche Unterschiede: er nahm mit zunehmendem Blattalter ab.

Im weiteren Versuch wurden die Pflanzen in unterschiedliche Testlösungen umgesetzt und anschließend die Fluoreszenzparameter bestimmt.



**Abbildung 50: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach einwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Die Kultivierung der Pflanzen und die Messung der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte nach den in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Verfahren. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4.

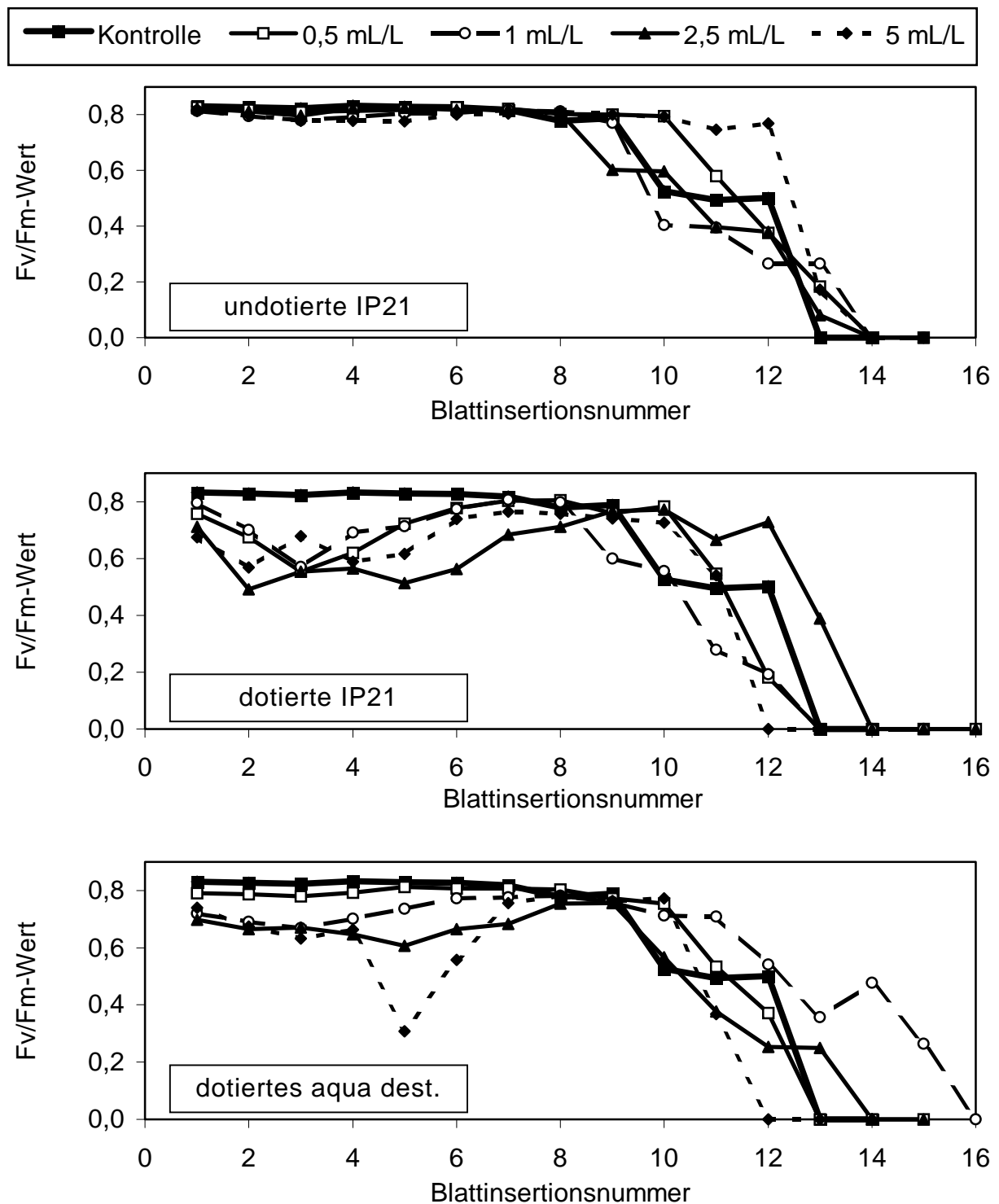
Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

Eine Woche nach Zusatz der drei Testlösungen wurden für die ca. 9 obersten Blätter der Kontrollpflanzen gleiche Fv/Fm-Werte von über 0,8 gemessen. Die Werte für die Blätter darunter, die zugleich ältere Blätter repräsentierten, sanken bedingt durch die natürliche Blattalterung stark ab (Abbildung 50).

An den in den dotierten Testlösungen kultivierten Tabakpflanzen wurden durch die Messung des Vitalitätsindex Fv/Fm bereits erste Störungen detektiert: Der Fv/Fm-Wert der obersten drei Blätter sank auf Werte zwischen 0,8 und 0,7. Da lediglich die zwei höchsten Konzentrationen der Testlösungen zu einer Veränderung von Fv/Fm führten, deutete sich hier bereits eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Wirkung an. Die einwöchige Kultivierung in reiner IP21-Lösung führte hingegen zu keiner Veränderung der Fv/Fm-Werte verglichen mit der Kontrolle.

Nach einwöchiger Kultivierung ergaben sich keine Unterschiede zwischen den  $A_{\max}$ -Werten der Kontrolle und den Pflanzen in den Testlösungen. Aus diesem Grund werden die Daten hier nicht dargestellt. Sie werden jedoch im Anhang (Tabellen A2-A4) aufgeführt.

In Abbildung 51 sind die Fv/Fm-Werte, die an den Tabakpflanzen nach vierwöchiger Kultivierung ermittelt wurden, dargestellt.



**Abbildung 51: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach vierwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

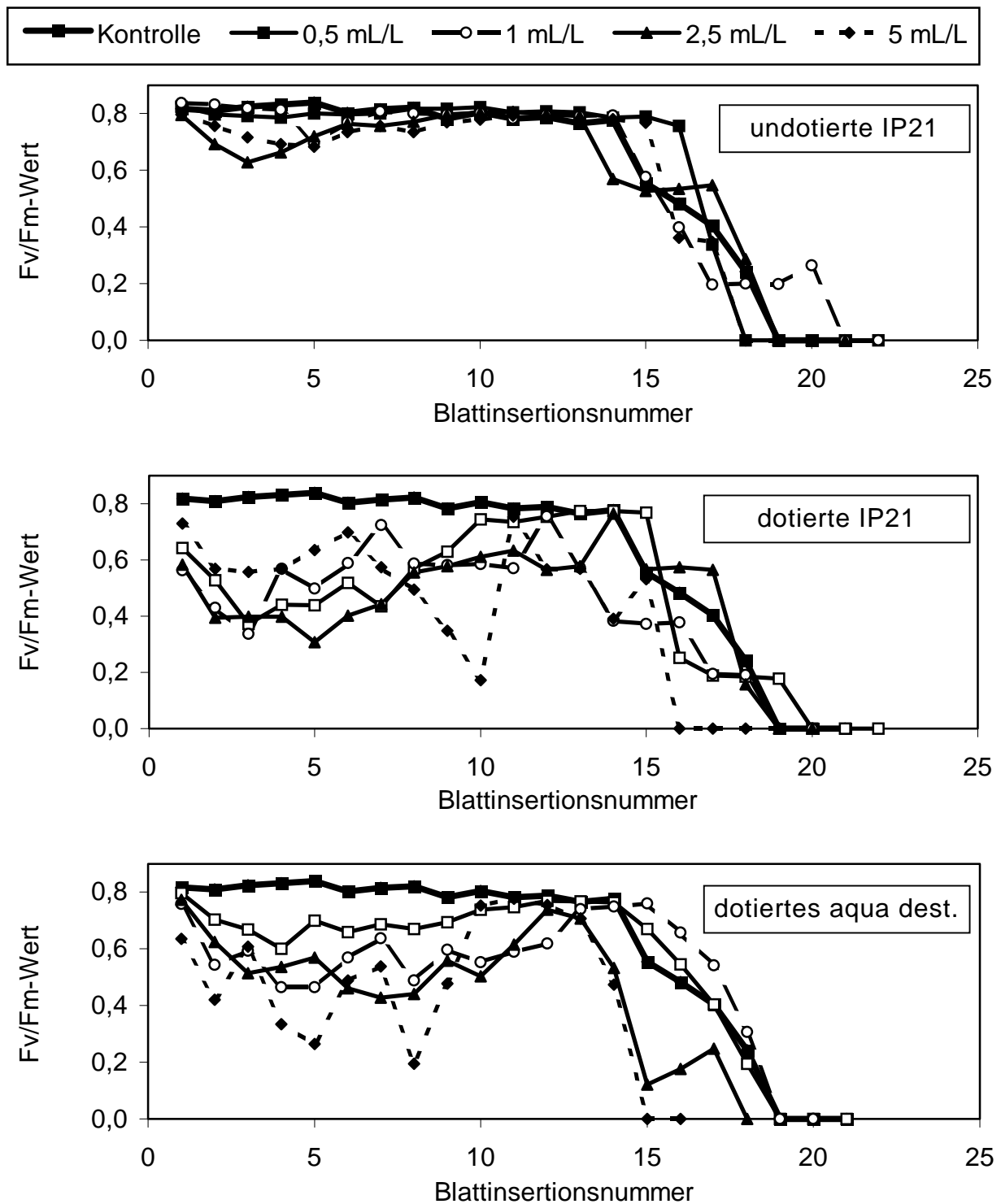
Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

Auch nach vierwöchiger Inkubationsdauer blieben bei den Kontrollpflanzen die Fv/Fm-Werte der obersten 10 Blätter mit ca. 0,8 nahezu konstant. Die Fv/Fm-Werte der älteren Blätter sanken, bis sie schließlich abfielen.

Während das oberste Blatt der unter Schwermetallstress kultivierten Pflanzen noch einen Fv/Fm-Wert von ca. 0,7 bis ca. 0,8 erreichte, sanken die Fv/Fm-Werte mit steigender Blattinsertionsnummer schrittweise, bis zwischen Blatt 4 und 6 ein Minimum erreicht wurde. Ausgehend von Blatt 4 bis 6 stieg der Quotient Fv/Fm bis zum ca. 10. Blatt wieder auf den Kontrollwert an (Abbildung 51). Pflanzen, die unter Schwermetallstress kultiviert wurden, zeigten somit gegenüber der ersten Woche eine verstärkte Ausprägung der mit der Messung von Fv/Fm detektierbaren Schädigung. Die Kultivierung in reiner IP21-Lösung führte auch nach der vierten Woche zu keiner Veränderung der Fv/Fm-Werte verglichen mit der Kontrolle.

Durch die große Schwankungsbreite der  $A_{\max}$ -Werte zwischen den unterschiedlichen Pflanzen und Blättern führten die Messungen der  $A_{\max}$ -Werte zu keinen deutlichen Ergebnissen. Daher wird auf die Darstellung der Ergebnisse hier verzichtet. Die Daten sind im Anhang (Tabellen A5-A7) wiedergegeben.

Abbildung 52 zeigt die Werte für Fv/Fm nach achtwöchiger Kultivierung der Tabakpflanzen in den Testlösungen.



**Abbildung 52: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach achtwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz  
 Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

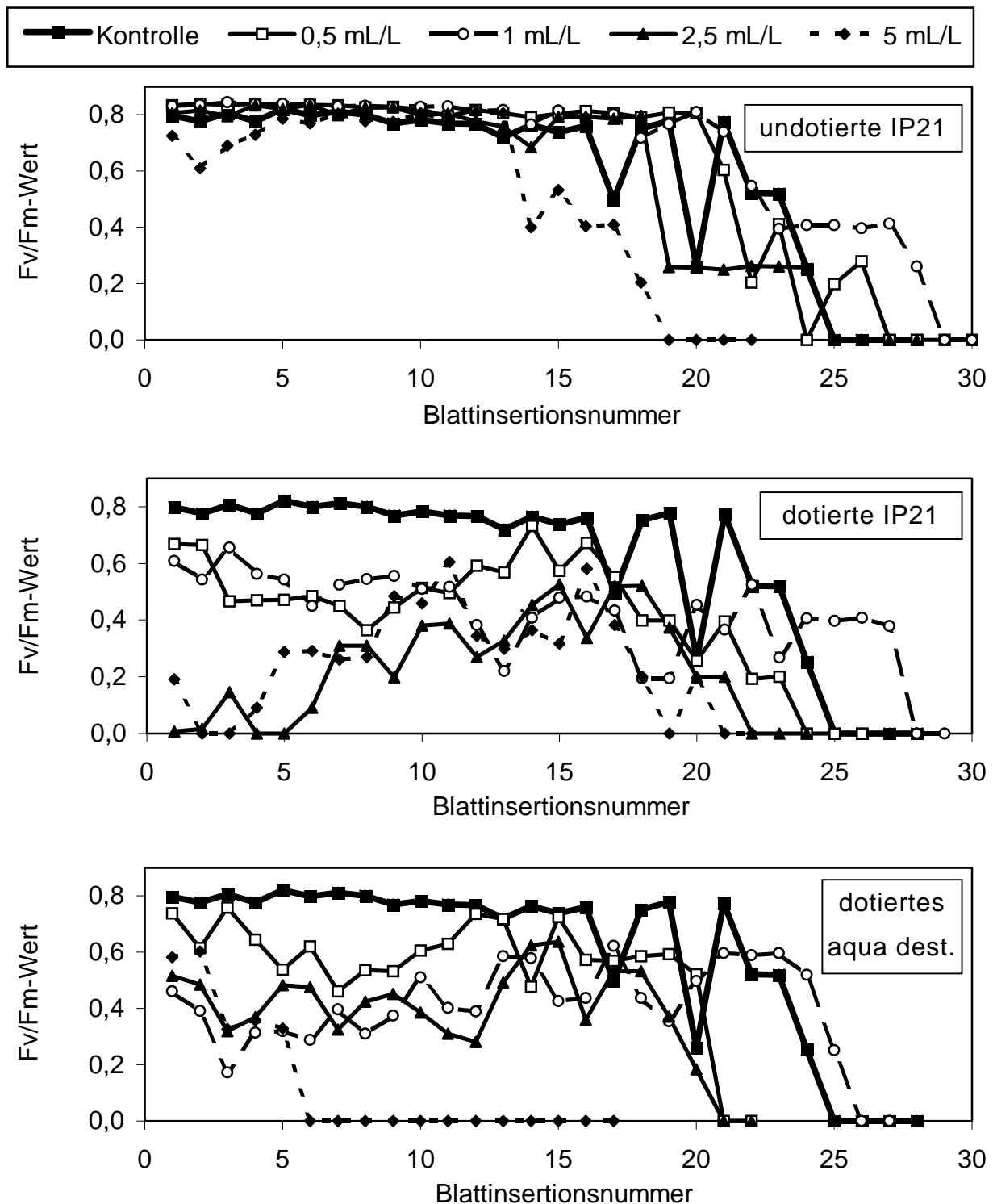


Nach achtwöchiger Kultivierung der Tabakpflanzen in den beiden dotierten Lösungen wurde das mit der Messung von Fv/Fm erzielte Ergebnis noch deutlicher, als sich schon nach der vierten Woche abzeichnete. Das oberste Blatt an der Sproßspitze wurde bereits leicht geschädigt und wies abhängig von der eingesetzten Lösung bzw. ihrer Konzentration einen Fv/Fm von 0,8 bis ca. 0,6 auf. Mit zunehmendem Blattalter sanken die Fv/Fm-Werte, bis zwischen Blatt 5 und 10 ein Minimum erreicht wurde und der Quotient bis etwa Blatt Nummer 15 erneut anstieg. Nach dem 15. Blatt erfolgte die durch die Blattalterung bedingte Abnahme von Fv/Fm in den Kontrollpflanzen und in den dotierten Lösungen gleichermaßen.

Auch die Kultivierung in den beiden höchsten Konzentrationen der undotierten IP21-Lösung hatte nun geringe Auswirkungen auf die Fv/Fm-Werte einiger Blätter. Das jeweils oberste Blatt wies zwar noch Fv/Fm-Werte auf, die dem der Kontrolle entsprachen, mit zunehmender Blattinsertionsnummer sanken die Fv/Fm-Werte jedoch bis auf Werte zwischen 0,6 und 0,7 ab. Danach stiegen sie wieder bis auf das Niveau der Kontrolle.

Da die  $A_{\max}$ -Werte im Vergleich mit den Fv/Fm-Werten nicht zu qualitativ anderen Aussagen über die Wirkungen der Testlösungen führten, werden die Meßergebnisse hier nicht dargestellt, sind jedoch im Anhang (Tabellen A8-A10) aufgeführt.

In den Abbildungen 53 und 54 sind die Ergebnisse der Messungen der Fv/Fm- und der  $A_{\max}$ -Werte nach 14 wöchiger Kultivierung der Tabakpflanzen in den Testlösungen wiedergegeben.



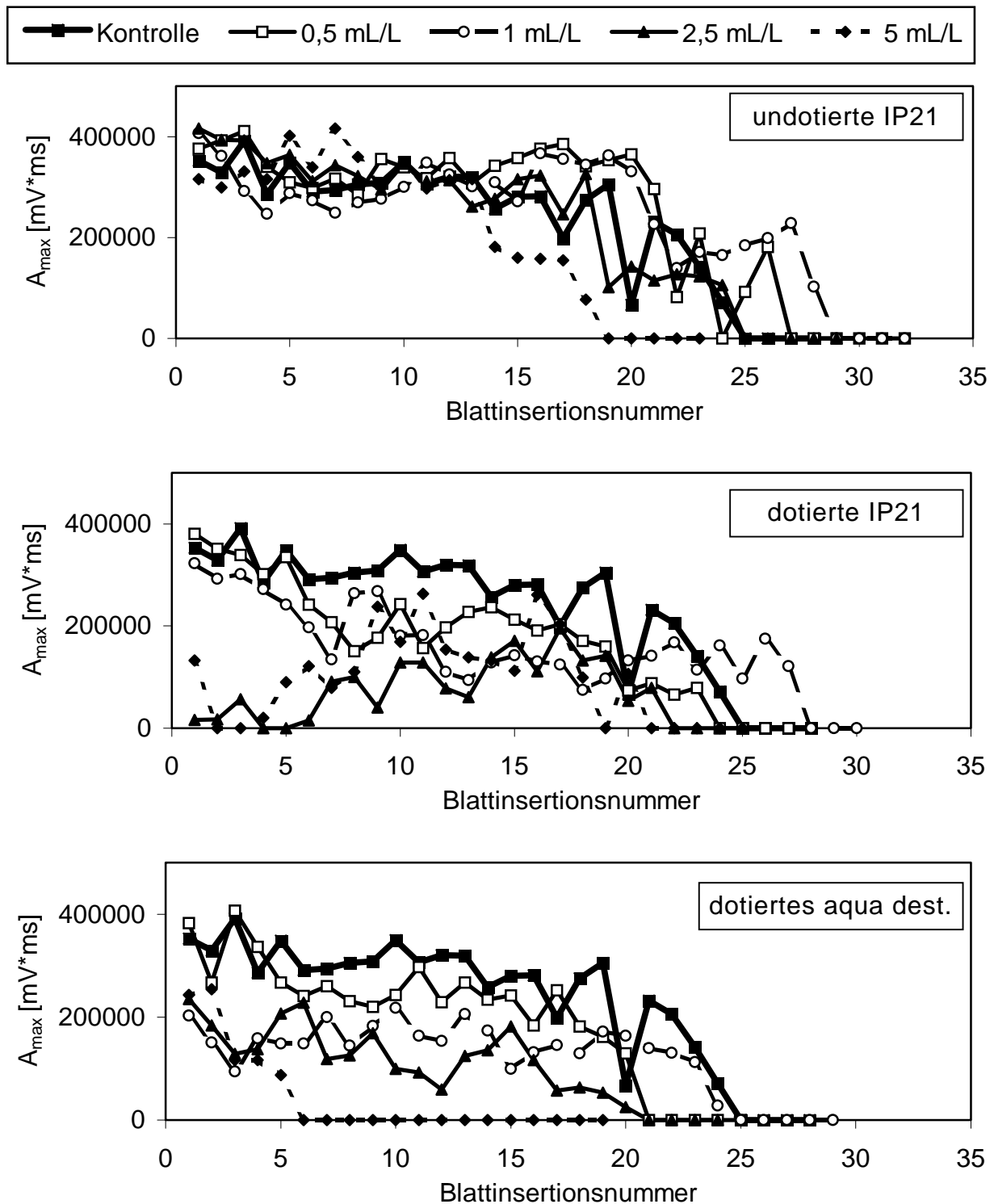
**Abbildung 53: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz  
Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

Nach 14-wöchiger Inkubation mit den dotierten Testlösungen verstärkten sich die bisher beobachteten Effekte weitgehend. Der Fv/Fm-Wert der oberen Blätter sank gegenüber der achten Woche weiterhin. In einigen Fällen sanken die Fv/Fm-Werte zwar mit zunehmendem Blattalter noch bis zu einem Minimum und stiegen danach wieder an, in anderen waren die Pflanzen jedoch bereits so gravierend geschädigt, daß die sonst noch relativ ungeschädigten Blätter der Sproßspitze nahezu vollständig zerstört waren oder sogar die gesamten Pflanzen annähernd abgestorben waren.

Die durch die undotierte IP21-Lösung verursachten Schädigungen waren nach 14-wöchiger Inkubation immer noch gering. Nur bei einem Zusatz von 5 mL/L unterschieden sich die Fv/Fm-Werte von der Kontrolle.



**Abbildung 54:**  $A_{max}$ -Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach vierzehn-wöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

Die  $A_{\max}$ -Werte der Pflanzen in der undotierten Lösung unterschieden sich nach der 14-wöchigen Inkubation nicht von der Kontrolle.

Für die höheren Konzentrationen der beiden dotierten Lösungen war ein deutlicher Unterschied zu den  $A_{\max}$ -Werten der Kontrolle zu erkennen. Dies bedeutet, daß die Pflanzen stark geschädigt waren, wie auch die Messung der Fv/Fm-Werte erkennen ließ.

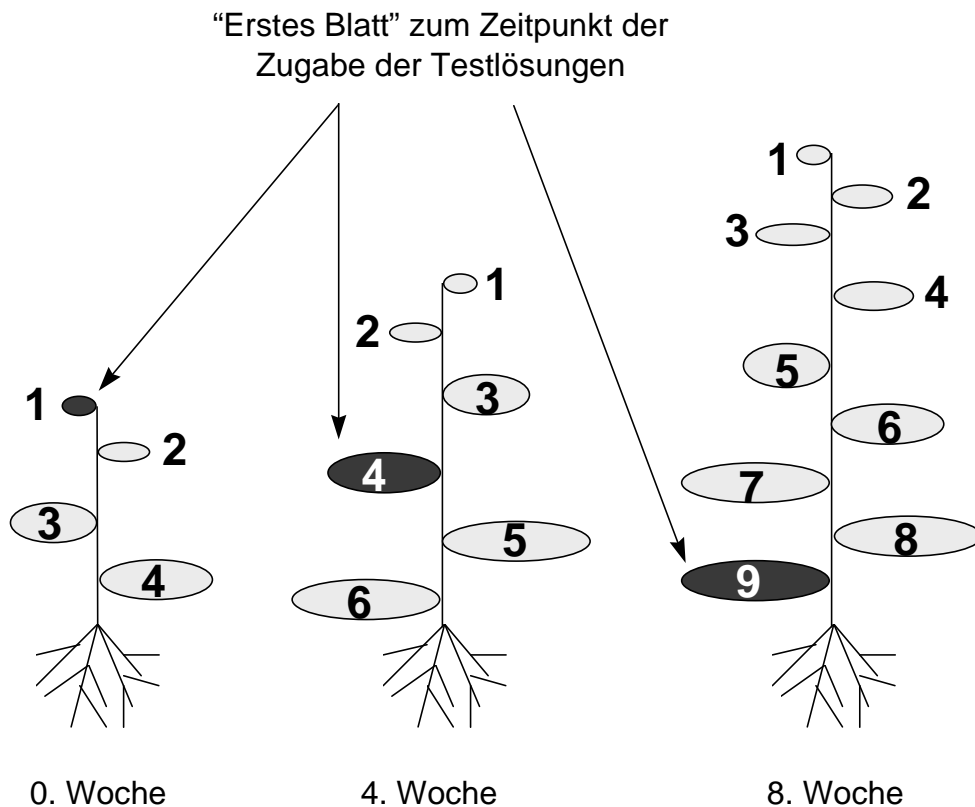
Die Messung der Fv/Fm-Werte der Chlorophyllfluoreszenz führte über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Wochen hinweg zu eindeutigen Informationen über den Zustand des Photosyntheseapparates der Testpflanzen. Unterschiede zwischen den Effekten der drei unterschiedlichen Testlösungen, auch verglichen mit der Kontrolle, konnten durch die Aufnahme der Fv/Fm-Werte sicher erfaßt werden.

Dies war mit der Messung der  $A_{\max}$ -Werte nicht immer möglich. Erst als die Pflanzen bereits sehr stark geschädigt waren, konnten eindeutige Unterschiede zwischen den Wirkungen der Testlösung und der Kontrolle detektiert werden.

Aus diesem Grund ist die Betrachtung der Fv/Fm-Werte für Studien zur Wirkung der Testlösungen auf die gesamten Tabakpflanzen besser geeignet als die Messung der  $A_{\max}$ -Werte.

Die Messung von Fv/Fm führte in fast allen Fällen zu folgendem Ergebnis: von einem relativ hohen Anfangswert für das oberste Blatt sanken die Werte zur Sproßbasis hin auf einen Minimalwert. Mit zunehmendem Blattalter stiegen sie dann wieder bis zur Größe der Werte der Kontrolle an. Dieses Phänomen wurde bei allen drei unterschiedlichen Testlösungen beobachtet.

Um den Grund für dieses einheitliche Verhalten zu untersuchen, wurde die Veränderung der Blatinversionsnummer des zum Zeitpunkt der Zugabe der Testlösungen "ersten Blattes" während der Inkubationszeit näher betrachtet. Zur Erläuterung, welches Blatt mit dem "ersten Blatt" bezeichnet wurde, ist in Abbildung 55 eine Tabakpflanze über einen Zeitraum von acht Wochen schematisch dargestellt.

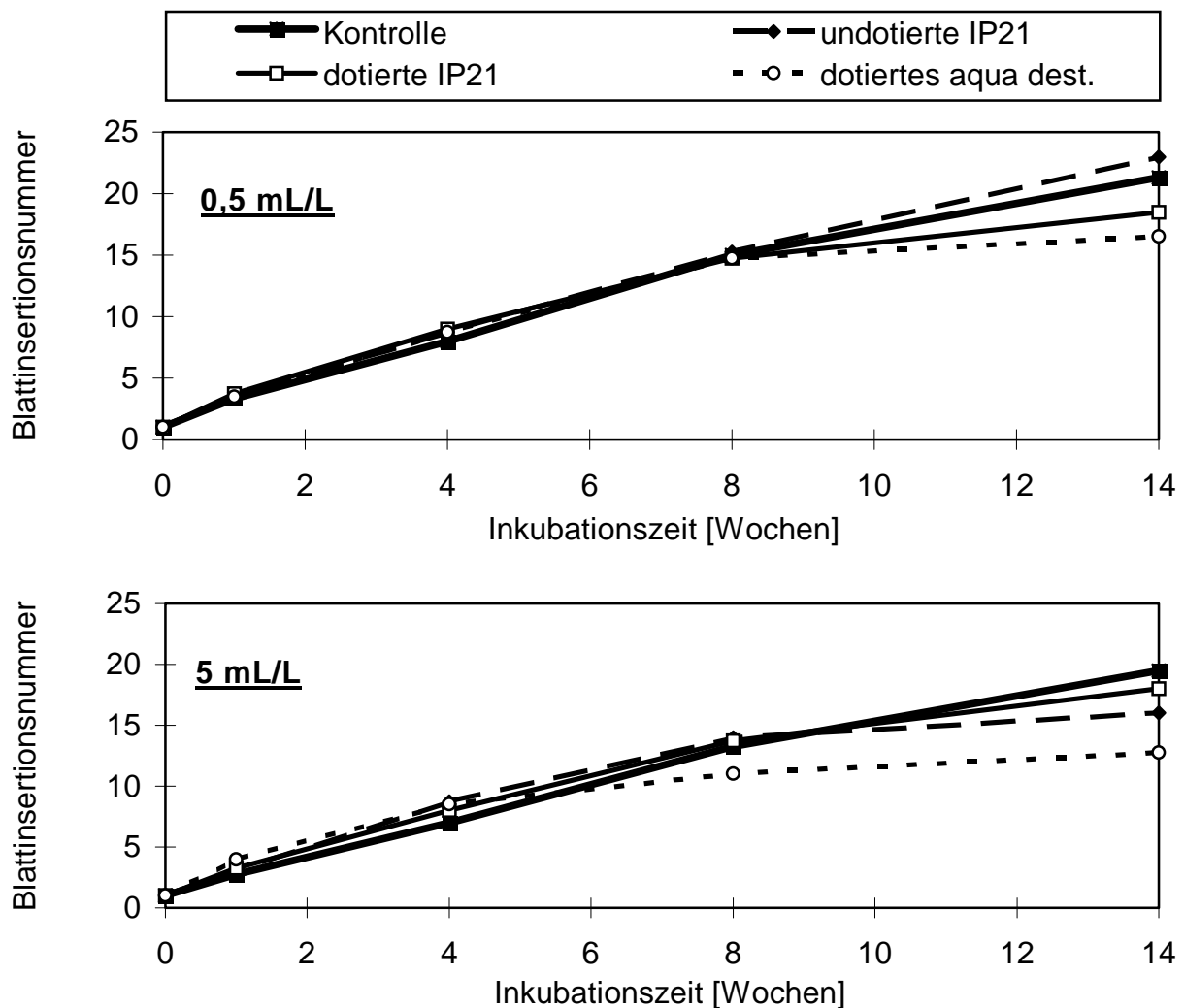


**Abbildung 55: Schematische Darstellung einer Tabakpflanze in der nullten, der vierten und der achten Woche der Kultivierung mit den Testlösungen.**

Das "erste Blatt" zum Zeitpunkt der Zugabe der Testlösungen wurde schwarz markiert. Die Blätter wurden mit ihrer jeweiligen Blatinserktionsnummer gekennzeichnet.

Das "erste Blatt" repräsentierte das oberste Blatt der Tabakpflanzen am Tage der ersten Messung vor der Kultivierung in den Testlösungen (0. Woche). Die Bildung und Entwicklung dieses Blattes verlief daher ohne den Einfluß der Testlösungen. Alle weiteren Blätter, die nach diesem gebildet wurden, standen hierbei unter der möglichen Einwirkung der Testlösungen. Im Zuge der weiteren Kultivierung wurde die Blatinserktionsnummer des "ersten Blattes" durch die Entwicklung neuer Blätter immer größer, wobei dieses "erste Blatt" dann z.B. in der 4. Woche von der Sproßspitze gesehen das Blatt mit der Insertionsnummer vier wurde, usw.

In Abbildung 56 ist die Inkubationszeit gegen die Blatinserktionsnummer des "ersten Blattes" aufgetragen. Ausgewählt wurden die Testpflanzen, die der geringsten und der höchsten verwendeten Konzentrationen der zugesetzten Testlösungen ausgesetzt waren.



**Abbildung 56: Einfluß verschiedener Testlösungen auf die Geschwindigkeit der Blattneubildung an der Sproßspitze von *Nicotiana*.**

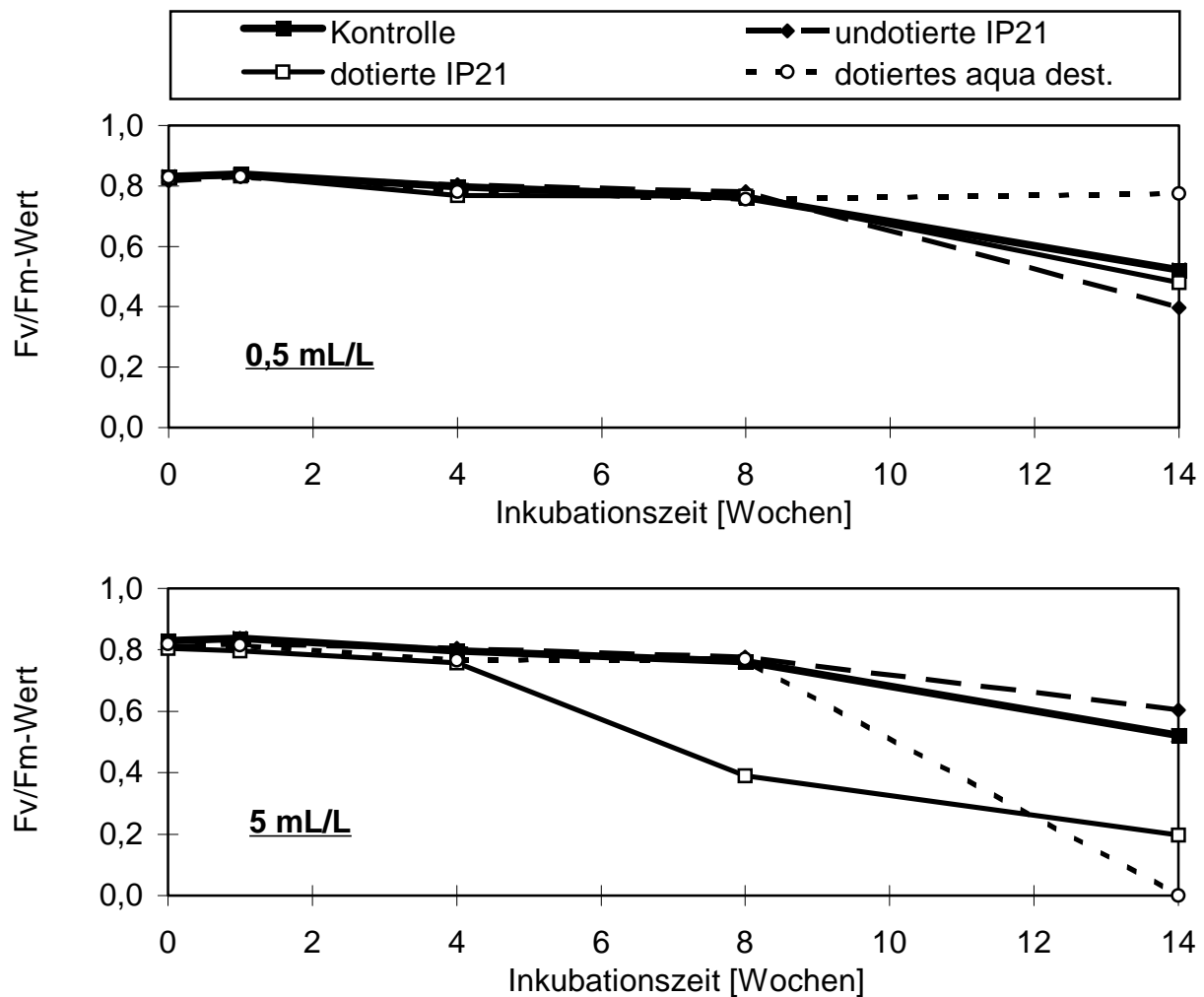
Die jeweilige Blattinsertionsnummer eines markierten Blattes wurde über einen Zeitraum von 14 Wochen, bedingt durch die Entwicklung neuer Blätter an der Sproßspitze, erhöht.

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte nach dem in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Verfahren. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen.

Das Wachstum der Tabakpflanzen verlief bis zur achten Inkubationswoche fast völlig synchron, d.h. daß die Blattneubildung bei den Pflanzen mit identischer Geschwindigkeit erfolgte. Lediglich die Pflanzen in 5 mL/L des dotierten aqua dest. bildeten neue Blätter etwas langsamer. Erst danach erfolgte die Blattneuentwicklung unterschiedlich schnell, so daß sich daraus nach 14-wöchiger Inkubation differierende Blattinsertionsnummern für das "erste Blatt" ergaben. Hierbei unterschieden sich zwar die in der Abbildung 56 eingetragenen Mittelwerte leicht

voneinander, diese Unterschiede waren jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant.

In Abbildung 57 sind die Fv/Fm-Werte der “ersten Blätter” sowohl für die niedrigste als auch für die höchste zugesetzte Konzentration aller Testlösungen zusammen mit der Kontrolle über den 14 wöchigen Inkubationszeitraum aufgetragen.



**Abbildung 57: Wirkung von drei verschiedenen Testlösungen auf den Fv/Fm-Wert desjenigen Blattes mit der Blatinversionsnummer 1 zu Versuchsbeginn (das “erste Blatt”).**

Die Kultivierung der Pflanzen und die Messung der Fv/Fm-Werte erfolgte gemäß den in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Verfahren. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen.

Die ermittelten Fv/Fm-Werte unterschieden sich bis zur achten Inkubationswoche für alle Testansätze (ausgenommen 5 mL/L dotierte IP21-Lösung) nicht von der



Kontrolle (Abbildung 57). Wurden die Pflanzen nur mit einem Zusatz von 0,5 mL/L undotierter oder dotierter IP21-Lösung kultiviert, setzte sich dieses Ergebnis auch bis zur 14. Inkubationswoche fort. Der Fv/Fm-Wert für das "erste Blatt" der Pflanzen in 0,5 mL/L dotiertem aqua dest. blieb auch in der 14. Inkubationswoche noch unverändert hoch, da diese sich, wie in Abbildung 56 gezeigt, langsamer entwickelten.

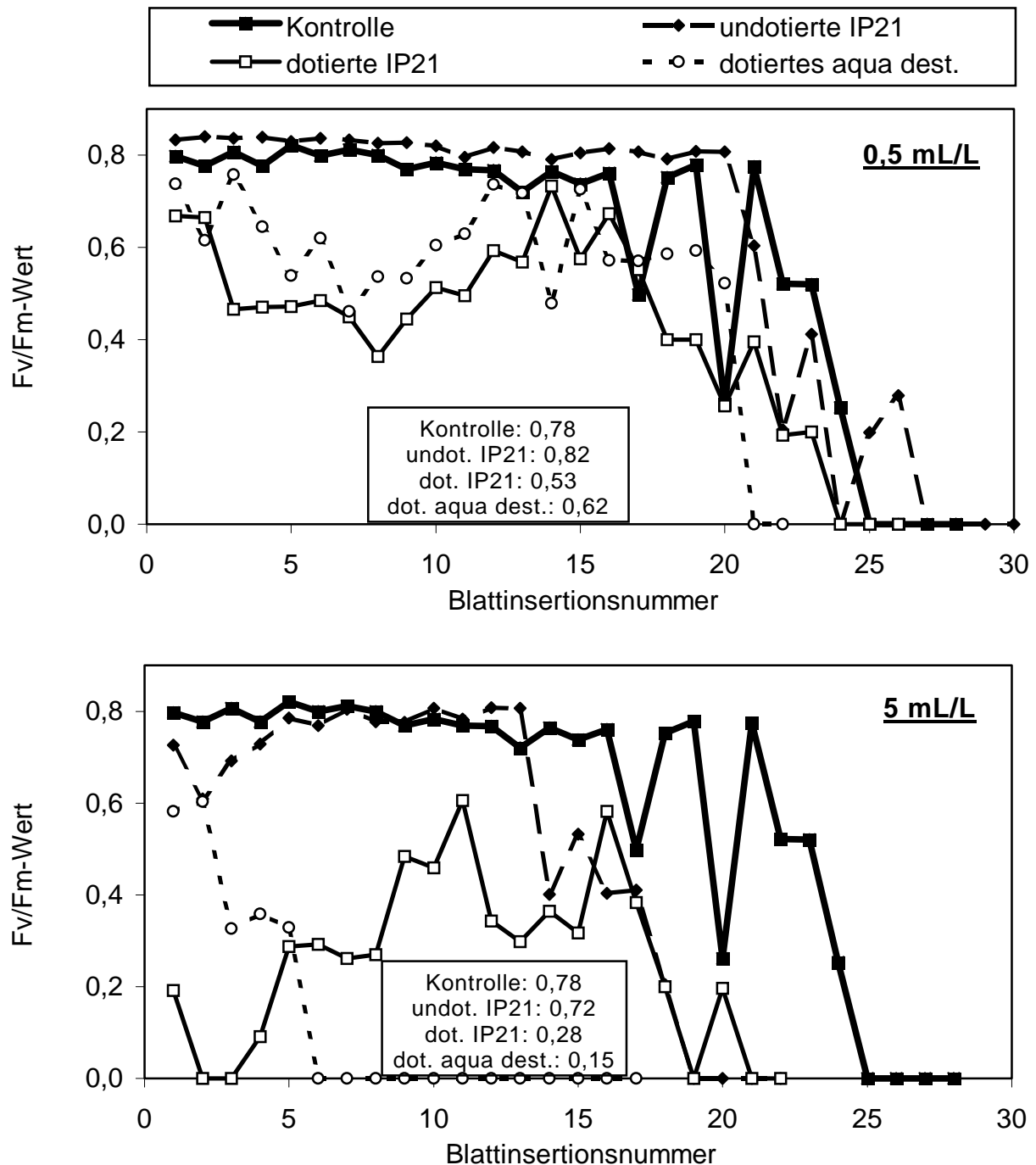
Wurden die Pflanzen mit einem Zusatz von 5 mL/L kultiviert, so waren die Schädigungen an den Pflanzen in dotierter IP21-Lösung und dotiertem aqua dest. bereits nach der achten bzw. 14. Inkubationswoche so gravierend, daß auch das "erste Blatt" betroffen war und sich sein Fv/Fm-Wert daher von der Kontrolle unterschied.

#### *Schlußfolgerung*

Die dargestellten Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß die Blätter, die zu Beginn der Kultivierung in den Testlösungen bereits ausgebildet waren, keine direkte Schädigung durch diese erfuhren, es sei denn die gesamte Pflanze starb durch zu hohe Schwermetalldosen ab. Darin lag der Grund, daß die Fv/Fm-Werte der Blätter an der Sproßbasis sich in den meisten Fällen nicht von denen der Kontrolle unterschieden. Diese Blätter waren zu Beginn der Kultivierung in den Testlösungen bereits ausgebildet.

#### **3.3.3.2 Quantitative Unterschiede der Schädigungen der drei Testlösungen auf die Chlorophyllfluoreszenz von *Nicotiana***

Die Tabakpflanzen wurden drei verschiedenen Streßarten ausgesetzt: einem reinen Salzstreß (undotierte IP21-Lösung), einem kombinierten Salz-Schwermetallstreß (dotierte IP21-Lösung) und einem reinen Schwermetallstreß (dotiertes aqua dest.). Um die Effekte dieser drei Streßtypen auf die Chlorophyllfluoreszenz zu vergleichen, sind in Abbildung 58 die Ergebnisse der Fv/Fm Messungen an jeweils der niedrigsten (0,5 mL/L) und der höchsten (5 mL/L) der eingesetzten Konzentrationen der Testlösungen und der Kontrolle dargestellt. In Abbildung 58 ist die Messung nach der 14. Inkubationswoche dargestellt, die sich qualitativ nicht von denen in der vierten und achten Inkubationswoche unterscheidet.



**Abbildung 58: Vergleich der Wirkungen der drei Testlösungen auf den Fv/Fm-Wert von *Nicotiana* nach vierzehnwöchiger Kultivierung mit den Lösungen in zwei verschiedenen Konzentrationen.**

Messung der Fv/Fm-Werte und Kultivierung der Pflanzen: Kapitel 2.3.6.

Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4.

Die Zahlen in der Abbildung geben die Mittelwerte der Fv/Fm-Werte der obersten 15 Blätter der jeweiligen Pflanzen an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen.

Zur Untersuchung, ob sich die in Abbildung 58 dargestellten Kurven signifikant voneinander unterscheiden, wurden die zugrundeliegenden Daten einem ANOVA Test unterzogen. Hierbei wurden nur die Blätter, die unter Einfluß der Testlösungen gebildet wurden, nicht aber diejenigen, die bereits vorher existierten, miteinander verglichen. Aus diesem Grund gingen jeweils die Fv/Fm-Werte der obersten 15 Blätter in die Berechnung ein.

Für beide in Abbildung 58 dargestellten Grafiken ergab sich folgendes Ergebnis: Die Daten der Kontrolle unterschieden sich nicht signifikant von denen der undotierten IP21-Lösung. Alle anderen Kurven unterschieden sich hoch signifikant ( $p \leq 0.01$ : dotierte IP21  $\leftrightarrow$  dotiertes aqua dest.) oder höchst signifikant ( $p \leq 0.001$ : alle übrigen) voneinander.

Um die Unterschiede in den Wirkungen der einzelnen Testlösungen einfacher quantifizieren zu können, werden im Folgenden die Mittelwerte der Fv/Fm-Werte der jeweils obersten 15 Blätter der Pflanzen verglichen. Diese Blätter entstanden uneingeschränkt erst nach Beginn der Kultivierung mit den Testlösungen. Diese Berechnung wurde getrennt für die Kontrollpflanzen, diejenigen in 0,5 mL/L dotierter IP21-Lösung usw. vorgenommen.

Die Ergebnisse dieser Kalkulation wurden in der zugehörigen Abbildung eingetragen.

Abbildung 58 zeigt, daß Salz in geringer Konzentration keinen Einfluß auf die Chlorophyllfluoreszenz der Tabakblätter ausübte. Bei höheren Salzkonzentrationen wurden die Pflanzen aber schließlich auch geschädigt, erkennbar am geringeren Fv/Fm Mittelwert für 5 mL/L undotierte IP21-Lösung verglichen mit der Kontrolle (kein signifikanter Unterschied im ANOVA-Test der oberen 15 Blätter). Kam zu diesem Salzstreß noch ein zusätzlicher Schwermetallstreß hinzu (Kultivierung der Pflanzen in dotierter IP21-Lösung), so wurden die Tabakpflanzen gleichermaßen bei geringen wie auch bei hohen Konzentrationen dieser Testlösung geschädigt. Eine Kultivierung der Pflanzen mit den gleichen Schwermetallkonzentrationen jedoch ohne Salz (dotierte aqua dest.) führte ebenfalls zu einer Schädigung der Pflanzen. Diese war jedoch bei niedriger Konzentration der Schwermetalle geringer ausgeprägt als bei gleichzeitigem Salzzusatz (dotierte IP21-Lösung, Abbildung 58). In hohen Konzentrationen eingesetzt, verursachte die schwermetallhaltige Lösung ohne Salz

(5 mL/L dotiertes aqua dest.) hingegen eine stärkere Schädigung als die schwermetallhaltige Lösung mit zusätzlichem Salzgehalt (5 mL/L dotierte IP21-Lösung).

Dieses Experiment zeigte, daß bei der Schädigung von Pflanzen durch Schadstoffe ein Dosis-Effekt-Zusammenhang bestand, da die Beeinträchtigung der Photosynthese durch Erhöhung der Konzentration der Testlösungen zunahm bzw. bei der Salzlösung überhaupt erst entstand. Hinzu kam, daß die Testlösung, die nur Schwermetalle enthielt (dotiertes aqua dest.), bei einer Konzentration von 5 mL/L in der Nährlösung toxischer wirkte als die Lösung, die sowohl Schwermetalle als auch Salze in wirksamen Mengen beinhaltete (dotierte IP21-Lösung). Dieser Effekt war konzentrationsabhängig, da bei nur 0,5 mL/L der Testlösungen in der Nährlösung die Toxizität der dotierten IP21-Lösung überwog.

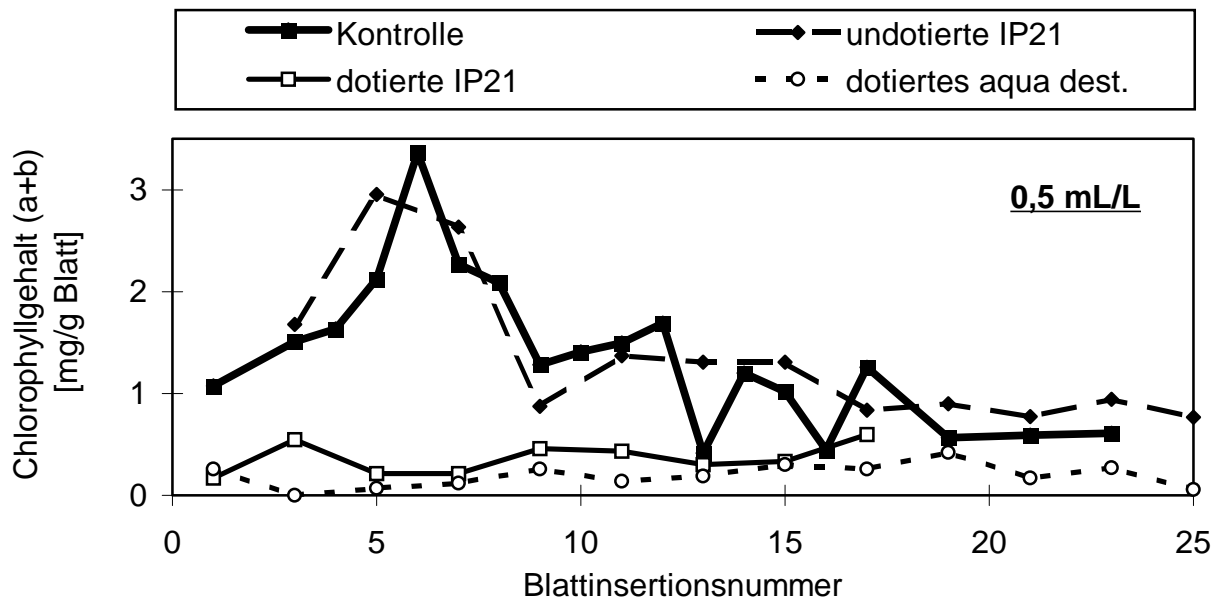
### **3.3.3.3 Veränderung des Chlorophyllgehaltes der Blätter und Einfluß der Stressoren auf die Biomasseproduktion**

#### *Chlorophyllgehalt der Blätter*

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz, deren Ergebnisse in den vorangegangenen Kapiteln (3.3.3.1 und 3.3.3.2) beschrieben wurden, zeigte eindeutig eine Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates durch den Einfluß der Testlösungen. Um die Fv/Fm-Werte mit den Chlorophyllgehalten der Blätter vergleichen zu können, erfolgte nach der 14-wöchigen Kultivierung der Pflanzen eine Chlorophyllbestimmung ihrer Blätter.

In der Darstellung dieser Ergebnisse wurde an dieser Stelle auf die Präsentation aller Konzentrationsstufen zu Gunsten der geringsten und der höchsten Konzentration (0,5 und 5 mL/L) verzichtet, da aus den Messungen der Konzentrationen dazwischen keine neuen Informationen erwuchsen.

In Abbildung 59 sind die Chlorophyllgehalte der Blätter der Kontrollpflanzen und der Pflanzen, die 14 Wochen mit den drei Testlösungen (0,5 mL/L) kultiviert wurden, aufgetragen.



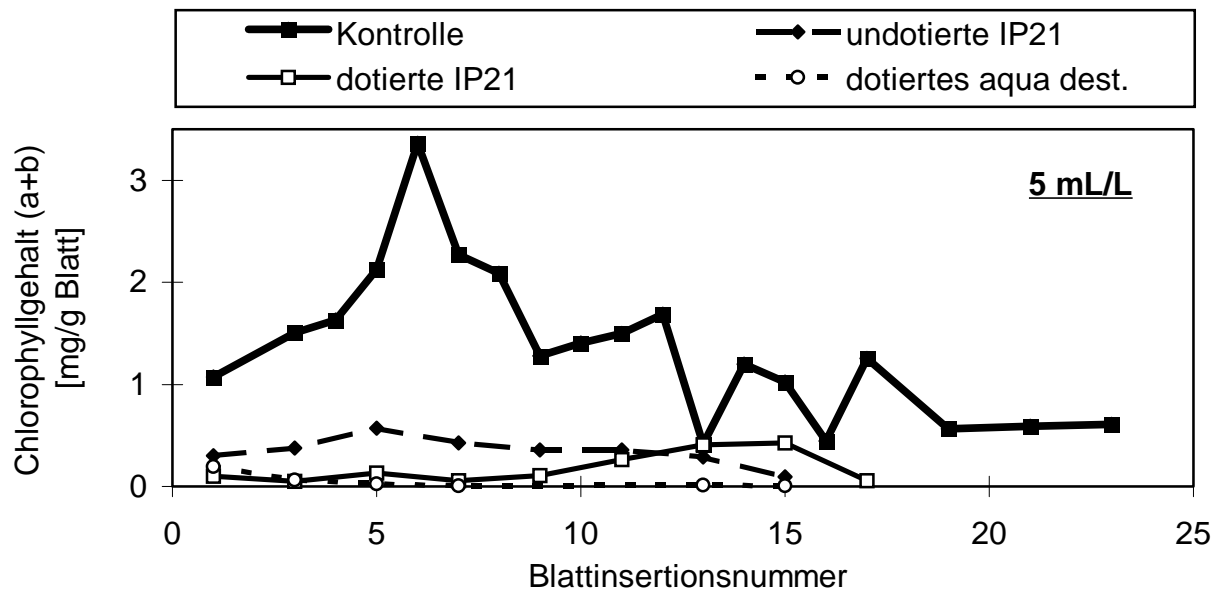
**Abbildung 59: Chlorophyllgehalt (a+b) der Blätter von *Nicotiana* nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in verschiedenen Testlösungen (0,5 mL/L) bzw. in reiner Nährlösung (Kontrolle).**

Die Kultivierung der Pflanzen wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Chlorophyllbestimmung: Kapitel 2.4.

Der Chlorophyllgehalt der Blätter der Kontrolle und der Pflanzen in der undotierten IP21-Lösung unterschied sich nicht maßgeblich voneinander. Er stieg zunächst beginnend mit dem obersten Blatt mit zunehmendem Blattalter gleichmäßig an, und nahm nach Erreichen eines Maximums im Bereich von Blatt Nummer 7 bzw. 5 wieder ab.

Die Blätter der Pflanzen, die in den beiden dotierten Testlösungen (0,5 mL/L) kultiviert wurden, wiesen unabhängig von der Blattetage einen geringen Chlorophyllgehalt auf.

Abbildung 60 zeigt den Chlorophyllgehalt der Blätter der Pflanzen, die mit einem Zusatz der Testlösungen von 5 mL/L kultiviert wurden.



**Abbildung 60: Chlorophyllgehalt (a+b) der Blätter von *Nicotiana* nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in verschiedenen Testlösungen (5 mL/L) bzw. in reiner Nährlösung (Kontrolle).**

Die Kultivierung der Pflanzen wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Chlorophyllbestimmung: Kapitel 2.4.

Die undotierte IP21-Lösung verursachte in dieser Konzentration wie die dotierten Testlösungen eine deutliche Reduzierung des Chlorophyllgehaltes der Blätter. Dabei waren die obersten und jungen Blätter ebenso betroffen wie die weiter an der Sproßbasis inserierten älteren Blätter. Die Kultivierung der Pflanzen in 5 mL/L dotiertem aqua dest. führte sogar zu einer völligen Zerstörung des Chlorophylls in den Blättern unterhalb des siebten Blattes. Von diesen Blättern konnte entsprechend auch keine Chlorophyllfluoreszenzdaten mehr ermittelt werden.

Diese Analysen zeigen, daß sowohl die Kultivierung der Pflanzen in reiner Salzlösung IP21 als auch die Kultivierung in den mit Schwermetallen dotierten Lösungen zu einer Schädigung der Chlorophyllsynthese und/oder zu einer höheren Abbaurate und einer Zerstörung des Chlorophylls führte. Allerdings war die undotierte IP21-Lösung erst ab einer höheren Konzentration wirksam als die beiden dotierten Testlösungen.

Die Bestimmung des  $F_v/F_m$ -Wertes und des Parameters  $A_{max}$ , wie sie in Kapitel 3.3.3.1 dargestellt wurden, beruhen auf der Fluoreszenz des Chlorophylls von Photosystem II (BOLHAR-NORDENKAMPF und ÖQUIST 1993). Diese Meßgrößen sind

kein direktes Maß für den Chlorophyllgehalt der Blätter, doch können sie durch eine Zerstörung des Blattchlorophylls beeinflusst werden (SAARINEN 1993).

#### *Korrelation zwischen Chlorophyllgehalt und Fluoreszenzparameter*

Im Folgenden wird die Korrelation zwischen dem Chlorophyllgehalt der Blätter und der in Kapitel 3.3.3.1 dargestellten Fluoreszenzparameter untersucht.

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach der 14. Inkubationswoche. Daher wurden die Ergebnisse dieser Analysen mit den in der 14. Wochen erzielten Fluoreszenzparametern verglichen. Die Fv/Fm-Werte der 14 Wochen lang mit den unterschiedlichen Testlösungen kultivierten Pflanzen sind in Abbildung 58 dargestellt. Da die Messung von  $A_{\max}$  keine qualitativ abweichende Aussage lieferte (Kapitel 3.3.3.1), wurde an dieser Stelle auf die Darstellung dieser Werte verzichtet.

Bei einem Vergleich der Chlorophyllgehalte der Kontrolle (Abbildungen 59 und 60) mit den Fv/Fm-Werten (Abbildung 58) wird deutlich, daß die Messung der Chlorophyllfluoreszenz kein Maß für den Chlorophyllgehalt darstellt: Trotz stark variierendem Chlorophyllgehalt blieb der Fv/Fm-Wert bis zum Blatt mit der 17. Insertionsnummer fast konstant.

Auch bei den Pflanzen, die in 0,5 mL/L undotierter IP21-Lösung kultiviert wurden, spiegelte sich der Rückgang der Fv/Fm-Werte vor dem fünften Blatt (Abbildung 58) im Chlorophyllgehalt der Blätter (Abbildung 59) nicht wider, da dieser dem der Kontrolle entsprach.

Die Pflanzen, die mit 5 mL/L undotierter IP21-Lösung kultiviert wurden, wiesen nur noch einen sehr geringen Chlorophyllgehalt auf (Abbildung 60). Dennoch wurden bei diesen Pflanzen noch Fv/Fm-Werte gemessen, die der Kontrolle entsprachen, d.h., daß ihr Photosyntheseapparat noch weitgehend intakt war. Mit der alleinigen Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wäre die Schädigung dieser Pflanzen daher überbewertet worden.

Auf der anderen Seite wird hier jedoch auch deutlich, daß sich mit der Messung der Fv/Fm-Werte nicht alle Schädigungen oder Veränderungen der Pflanzen detektieren lassen. Dies ist durch Vergleich der Fv/Fm-Werte und der Chlorophyllgehalte der Pflanzen, die mit 5 mL/L undotierter IP21-Lösung kultiviert wurden, erkennbar (Abbildungen 58 und 60). Die Fv/Fm-Werte der meisten Blätter der mit der Testlösung kultivierten Pflanzen unterschieden sich kaum von denen der Kontrolle,

obwohl der äußerst geringe Chlorophyllgehalt dieser Blätter anzeigte, daß die Pflanzen durch die Testlösung beeinträchtigt wurden.

#### *Schlußfolgerung*

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes der Blätter nicht zwangsläufig eine Aussage über den Grad der Schädigung des Photosyntheseapparates zuläßt. Aber auch durch die Messung der Chlorophyllfluoreszenz können nicht alle Auswirkungen von toxischen Eluaten auf die Photosynthese sicher detektiert werden.

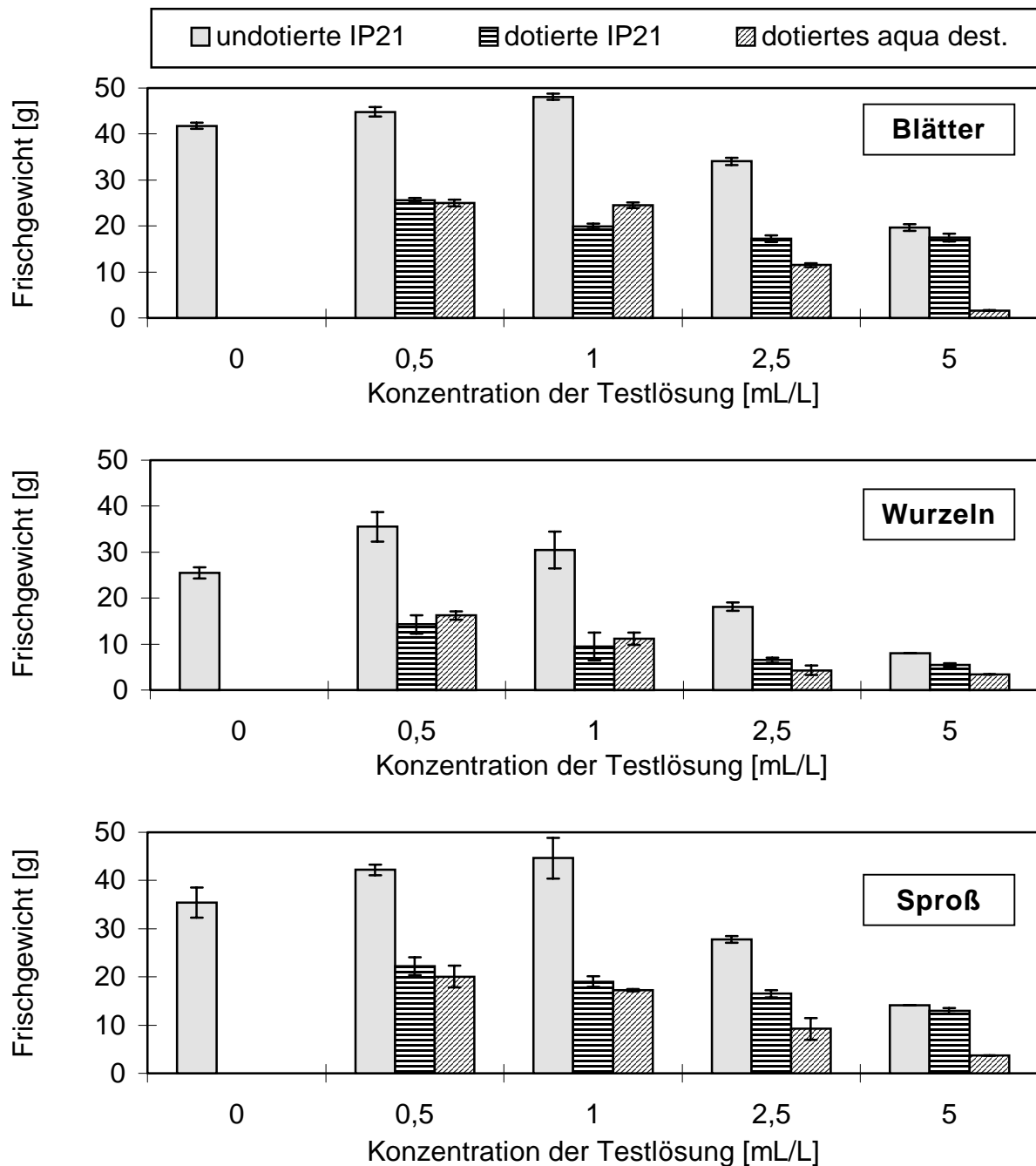
#### *Biomasseproduktion*

Das Wachstum der gesamten Pflanze und ihre Biomasseproduktion wird durch viele Schadstoffe beeinflusst. Neben der Messung von Schädigungen am Photosyntheseapparat durch Erfassung der Chlorophyllfluoreszenz kann die Wirkung der Testlösungen auf Pflanzen daher auch durch Bestimmung ihrer Biomasse, in Form des Frisch- oder Trockengewichtes, erfolgen. Aus diesem Grund existieren standardisierte Tests zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen auf der Basis ihrer Wachstumshemmung (Alga, Growth Inhibition Test: OECD Guidelines for Testing Chemicals 201, adopted 07.06.1984. Terrestrial Plants, Growth Test: OECD Guidelines For Testing Chemicals Nr. 208, adopted 04.04.1984).

Um die Eignung dieses Testprinzips für *Nicotiana tabacum* zu überprüfen, wurden die Pflanzen nach der 14-wöchigen Kultivierung unter Zusatz der drei Testlösungen jeweils in Wurzel, Stengel und Blätter aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Frischgewichtes. Das Trockengewicht konnte nicht ermittelt werden, da die Pflanzen noch für weitere Experimente (Chlorophyllbestimmung in diesem Kapitel, mikroskopische Untersuchungen und EDX-Analysen in Kapitel 3.3.3.4) benötigt wurden.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Frischgewichtes sind in Abbildung 61 nach Organen getrennt dargestellt. Hierbei entspricht das für 0 mL/L eingetragene Frischgewicht demjenigen des entsprechenden Organs der Kontrollpflanzen.





**Abbildung 61: Frischgewicht von *Nicotiana*, getrennt nach Blättern, Wurzeln und Sproß, nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in drei unterschiedlichen Testlösungen bzw. reiner Nährlösung (Konzentration der Testlösung: 0 mL/L).**

Die Kultivierung der Pflanzen wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Die Frischgewichtbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.4 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von voneinander unabhängigen Messungen an drei bzw. vier Pflanzen an.

Die Kultivierung der Pflanzen sowohl in der dotierten IP21-Lösung als auch im dotierten aqua dest. führte mit Zunahme der Konzentration dieser Testlösungen im

Nährmedium zu einer Abnahme des Frischgewichtes aller Organe. Dabei verursachte die Kultivierung der Pflanzen in diesen beiden Lösungen eine gleich starke Reduzierung der Wurzelbiomasse. Auf die Verminderung der Biomasse von Stengel und Blätter wirkte sich die Kultivierung im dotierten aqua dest. allerdings noch stärker aus als die dotierte IP21-Lösung.

Die Kultivierung der Pflanzen mit geringen Konzentrationen der undotierten IP21-Lösung führte zu einer Steigerung der Biomasseproduktion der drei Organe verglichen mit den Kontrollpflanzen. Bei höheren Konzentrationen (1 bzw. 2,5 mL/L) verursachte die Salzlösung jedoch eine Hemmung des Wachstums, die bei 5 mL/L etwa der durch die dotierte IP21-Lösung ausgelösten Minderung entsprach.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, daß die Bestimmung der Biomasseproduktion im Falle von *Nicotiana tabacum* und den hier gewählten Versuchsbedingungen zwar auch zur Detektion der Toxizität der Testlösungen führte, jedoch keine sichere Unterscheidung zwischen der Wirkung der reinen Salzlösung und der der schwermetallhaltigen Testlösungen erlaubte.

Wie bereits durch die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz (Kapitel 3.3.3.2) gezeigt wurde, ergab sich auch aus der Bestimmung der Biomasseproduktion, daß der einfache Streß (Schwermetall ohne Salz - dotiertes aqua dest.) in hohen Konzentrationen stärkere Auswirkungen auf die Pflanzen ausübte als der mehrfache Streß (Schwermetall plus Salz - dotierte IP21).

#### **3.3.3.4 Mikroskopische Untersuchungen und EDX-Analysen an *Nicotiana***

##### *Mikroskopische Untersuchungen*

Um weitere Informationen über die Wirkungsweise der Testlösungen auf die Pflanzen zu erhalten, wurde der Einfluß der dotierten IP21-Lösung auf die Blattmorphologie von Tabakpflanzen lichtmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden die Blätter derselben Pflanzen verwendet, mit denen die in Kapitel 3.3.3.1 und 3.3.3.2 beschriebenen Experimente durchgeführt wurden. Die Querschnitte der Blätter stammten demnach von Pflanzen, die über einen Zeitraum von 14 Wochen entweder in reiner Nährlösung (Kontrolle) oder Nährlösung unter Zusatz dotierter IP21-Lösung kultiviert worden waren.

Aus dem Vergleich der Blattquerschnitte der Kontrollpflanzen mit denen der gestreßten Pflanzen ergaben sich jedoch keine erkennbaren Unterschiede im Blattaufbau.

Auch die Wurzeln von Pflanzen, die Salz- oder Schwermetallstreß ausgesetzt sind, können geschädigt oder ganz zerstört werden (GODBOLD 1991). Daher ist auch eine derartige Wirkung der hohen Salz- und/oder Schwermetallkonzentrationen enthaltenden Testlösungen auf die Tabakwurzeln zu vermuten. Die Wurzeln sind das Organ zur Wasser- und Nährstoffaufnahme und bilden somit die Basis für alle Stoffwechselreaktionen der Pflanze. Ein Defekt der Wurzeln kann sich daher auf viele der bereits beobachteten Effekte der Testlösungen (Hemmung der Photosynthese, des Wachstums und der Chlorophyllsynthese) auswirken. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen der undotierten und der dotierten IP21-Lösung auf den Bau und den Zustand der Wurzeln der Tabakpflanzen untersucht. Hierfür wurden Wurzeln von Pflanzen verwendet, die 14 Wochen in Nährlösung kultiviert wurden, die mit dotierter und undotierter IP21-Lösung in Konzentrationen von jeweils 0,5 / 1 / 2,5 und 5 mL/L versetzt war. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die in reiner Nährlösung ohne Zusätze wuchsen.

Die Auswirkungen des dotierten aqua dest. auf die Wurzeln wurde nicht berücksichtigt, da hiervon keine neuen Aussagen über die prinzipiellen Wirkungen von Salz- und Schwermetallstreß zu erwarten waren.

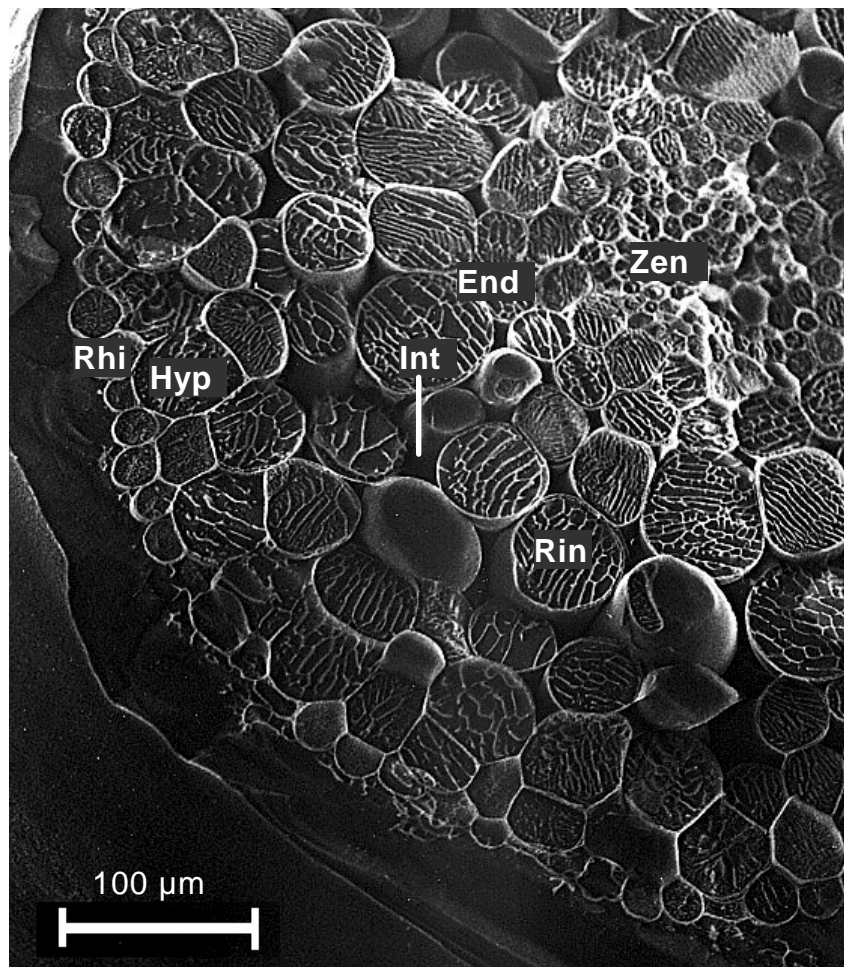
Die Wurzeln wurden für die Mikroskopie vorbereitet, indem sie mit den Objektträgern zusammen in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Anschließend wurden mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik unter Vakuum quer gebrochene Wurzelsegmente hergestellt, die im Rasterelektronenmikroskop untersucht wurden.

In den folgenden Abbildungen sind Fotos der quer gebrochenen Wurzelsegmente wiedergegeben. Diese Wurzeln wesen von außen nach innen folgende Zellschichten auf: eine Zellschicht von Rhizodermiszellen, eine von Hypodermiszellen, mehrere Schichten von Rindenzellen, eine Zellschicht von Endodermiszellen, die den Zentralzylinder einschlossen.

In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der unter Vakuum aufgebrochenen Wurzeln waren intakte Zellen an ihrer schuppenartigen Struktur von geschädigten Zellen, die dagegen unstrukturiert-schwarz erschienen, zu unterscheiden. Die Interzellularräume von ungeschädigten Wurzeln waren luftgefüllt und

daher als schwarze Hohlräume zwischen den Zellen zu erkennen. Im Falle einer defekten Wurzel waren die Interzellularräume mit Hydrokulturmedium gefüllt und daher grau-strukturiert.

In Abbildung 62 sind quer gebrochene Zellen der Wurzel einer Kontrollpflanze dargestellt.



**Abbildung 62: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments von *Nicotiana* (Kontrollpflanze).**

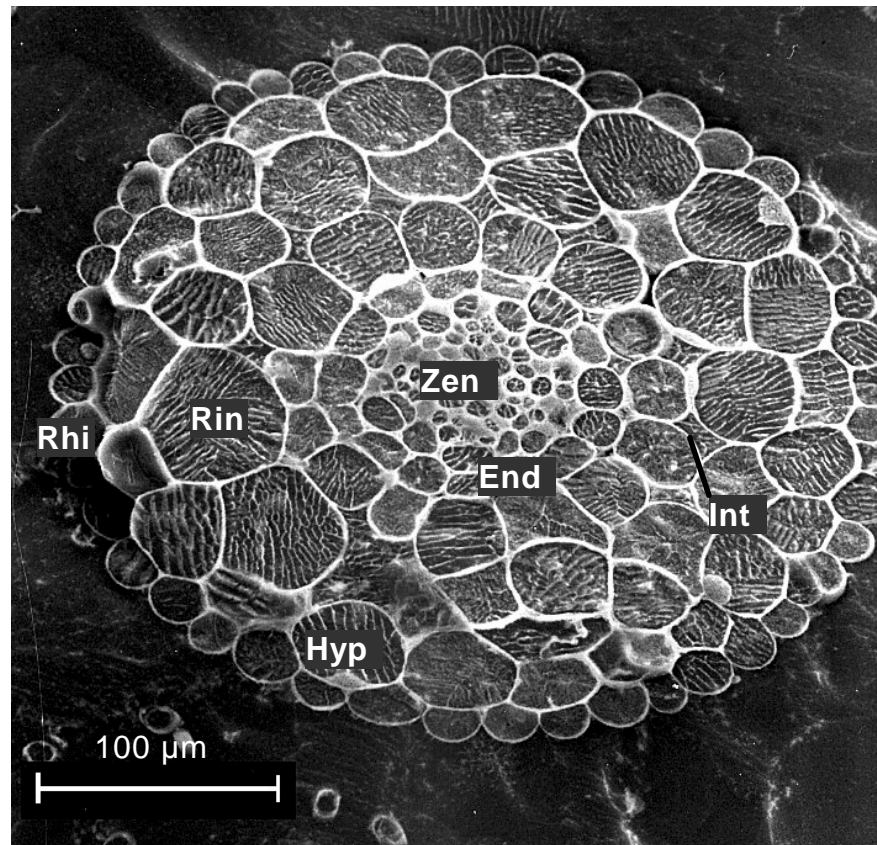
Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularräume

In dieser Aufnahme ist der Zustand einer Wurzel gezeigt, die nicht durch Schadstoffe geschädigt wurde, und wie erwartet waren an den Zellen dieser Wurzel auch keine Defekte zu erkennen. Die Zellen jedes Wurzelgewebes waren intakt (schuppenartigen Struktur) und die Interzellularräume luftgefüllt (schwarz).

*Effekte der undotierten Lösung auf die Wurzeln*

Das Foto eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer Pflanze, die in der geringsten eingesetzten Konzentration der undotierten IP21-Lösung (0,5 mL/L) wuchs, wird in Abbildung 63 gezeigt.



**Abbildung 63: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 0,5 mL/L undotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.1, Tabelle 3. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

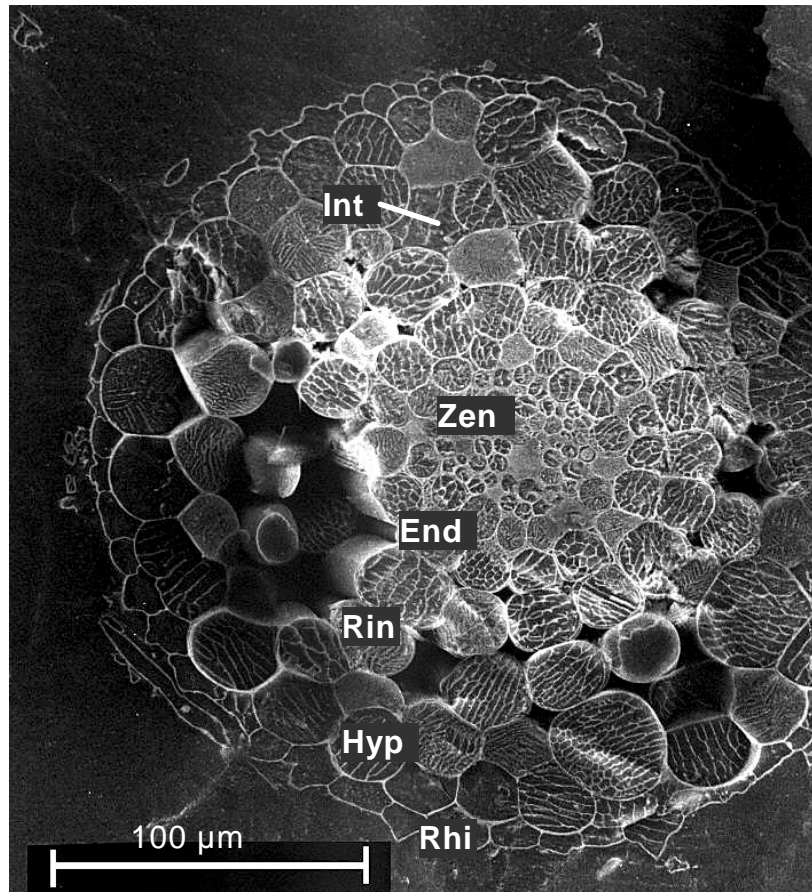
Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

Die Rhizodermis der Wurzel in Abbildung 63 wies bereits Anzeichen leichter Schädigungen auf: die Schuppenstruktur war innerhalb einiger Zellen nur noch sehr schwach ausgeprägt vorhanden. Die übrigen Wurzelgewebe erschienen jedoch sichtbar geschuppt und waren daher nicht oder nur kaum geschädigt. Allerdings waren nahezu alle Interzellularräume mit Hydrokulturmedium angefüllt. Dieses Foto



zeigt, daß bereits die geringste der eingesetzten Konzentrationen der undotierten Salzlösung zu deutlichen Defekten der Wurzel führte.

In Abbildung 64 ist ein quer gebrochenes Wurzelsegment einer Pflanze dargestellt, die in 1 mL/L Salzlösung wuchs.



**Abbildung 64: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 1 mL/L undotierter IP21-Lösung.**

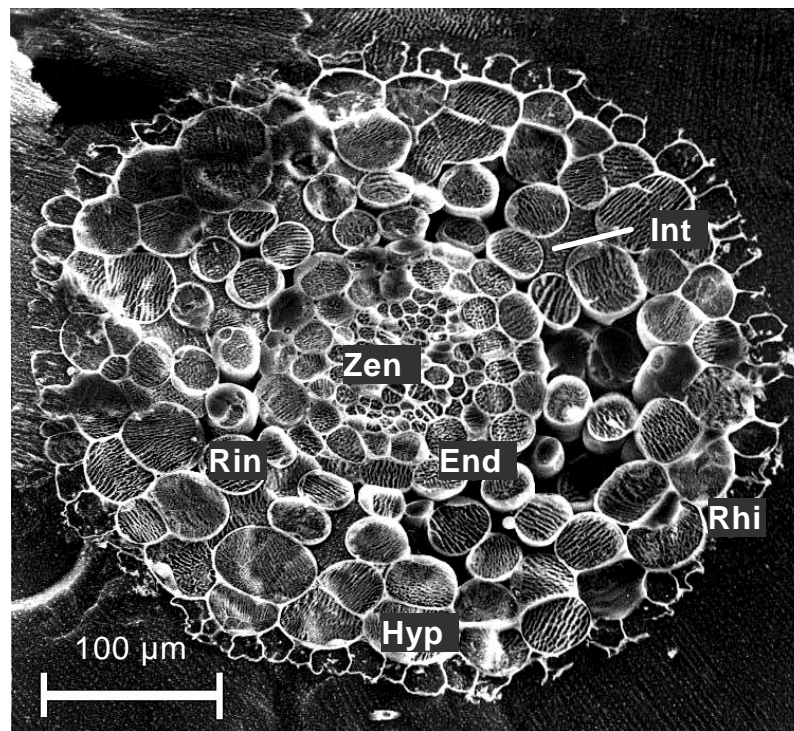
Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.1, Tabelle 3. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

Alle sichtbaren Rhizodermiszellen der Wurzel erschienen unstrukturiert-schwarz und waren ungleichmäßig geformt (Abbildung 64): Sie waren zerstört. Einigen Hypodermiszellen fehlte die Schuppenstruktur. Auch diese Zellen wurden durch das Salz in Mitleidenschaft gezogen. Die meisten Interzellularräume waren in diesem Beispiel zwar noch luftgefüllt, doch war auch hier in einige Hydrokulturmedium

eingedrungen. Die Zellen, die weiter im Inneren der Wurzel lagen, wie die der Endodermis oder des Zentralzylinders, wiesen keine sichtbaren Defekte auf.

Wurde eine noch höhere Salzkonzentration im Hydrokulturmedium eingesetzt, hatte dies für die Wurzel die in Abbildung 65 dargestellten Folgen. Diese Abbildung zeigt eine Wurzel, die mit 5 mL/L der Salzlösung kultiviert wurde.



**Abbildung 65: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quergebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 5 mL/L undotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.1, Tabelle 3. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

Die äußere Zellwand der meisten Rhizodermiszellen in Abbildung 65 war aufgebrochen. Alle Rhizodermiszellen waren zerstört. Auch die Zellwände einiger weiter im Wurzelinneren positionierten Zellen begannen sich aufzulösen und Hydrokulturmedium konnte in die Interzellularräume eindringen. In diesem Beispiel waren die Zellen im Inneren der Wurzel ebenfalls nicht sichtbar betroffen.

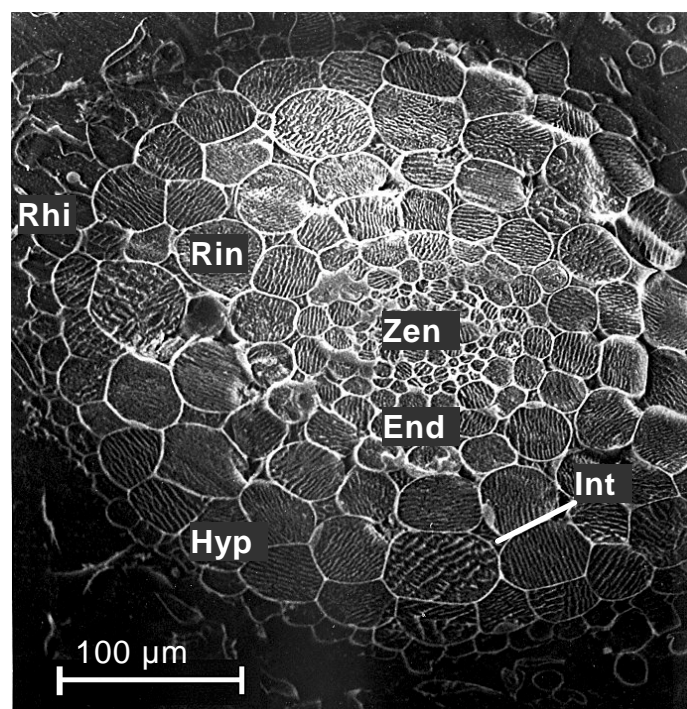
### *Zusammenfassung der Effekte der undotierten Lösung auf die Wurzeln*

Diese Beispiele zeigen, daß mit einer Erhöhung der Salzkonzentration auch eine verstärkte Wurzelschädigung einherging, die in der Peripherie begann und sich ins Zentrum der Wurzel fortsetzte.

### *Effekte der undotierten Lösung auf die Wurzeln*

Zum Vergleich der Effekte, die ein Schwermetallzusatz auf die Wurzeln ausübt, wurden auch quer gebrochene Wurzeln der Pflanzen aus der mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung mikroskopiert.

In Abbildung 66 sind die Folgen einer Kultivierung der Wurzeln in 0,5 mL/L dotierter IP21-Lösung dargestellt.



**Abbildung 66: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 0,5 mL/L dotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

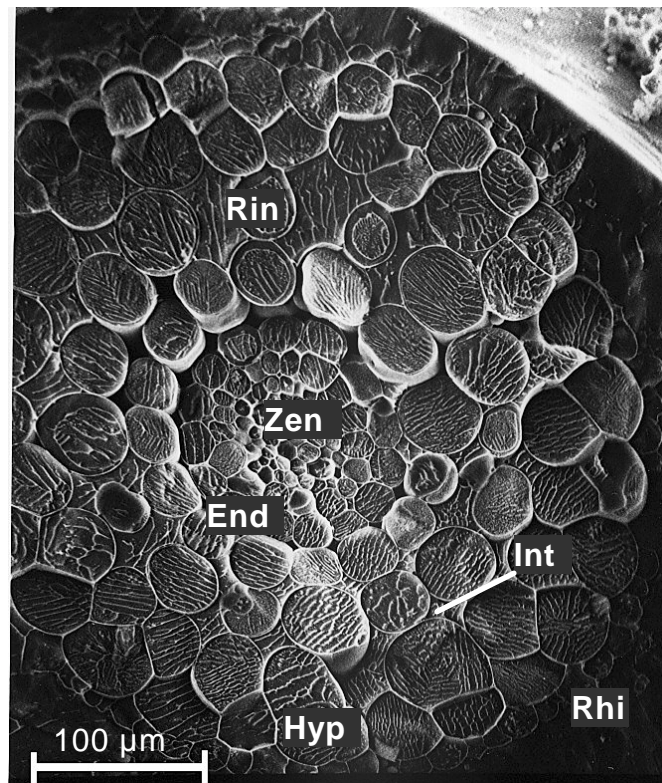
Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

Bereits bei dieser geringen Konzentration der schwermetallhaltigen Salzlösung waren die Rhizodermiszellen wesentlich stärker geschädigt als nach Kultivierung in



undotierter Salzlösung gleicher Konzentration. Auch mehrere Interzellularräume waren bereits mit Hydrokulturmedium gefüllt. Defekte an weiteren Geweben waren jedoch nicht zu beobachten.

Wurde die dotierte IP21-Lösung in höheren Konzentrationen eingesetzt, resultierten daraus Effekte, die in Abbildung 67 (Wurzel in 2,5 mL/L dotierter IP21-Lösung) dargestellt sind.



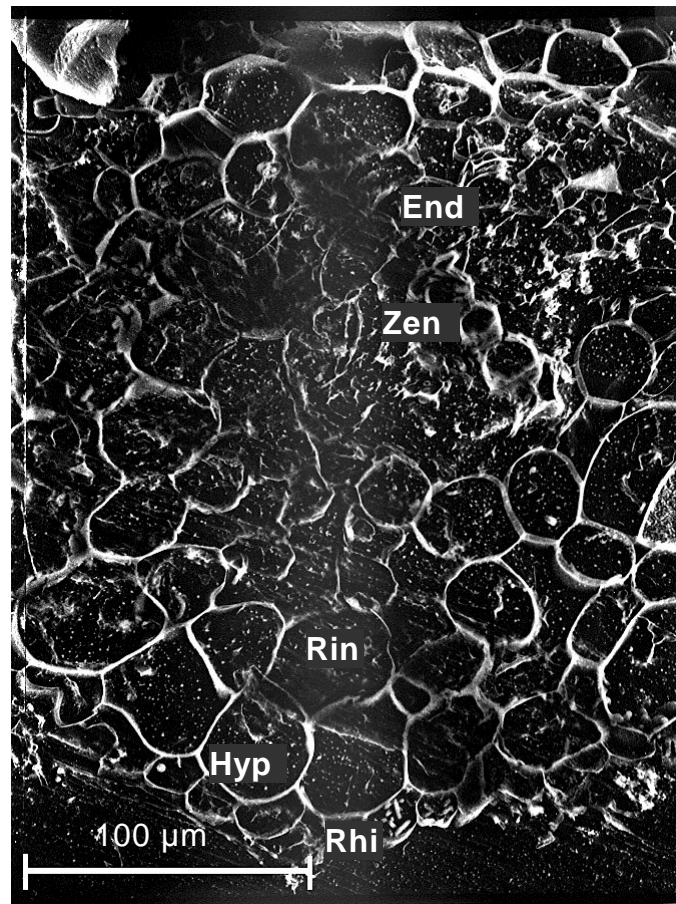
**Abbildung 67:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 2,5 mL/L dotierter IP21-Lösung.

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

Die Rhizodermiszellen der Wurzel in Abbildung 67 waren völlig zerstört. In den Zellschichten im Inneren der Wurzel selbst bis hin zur Endodermis, löste sich das Plasma von den Wänden. Hier setzten offensichtlich Plasmolysevorgänge ein. In viele Interzellularräume war Hydrokulturmedium eingedrungen.

Die Wirkungen noch höherer Konzentrationen (5 mL/L) der dotierten IP21-Lösung sind in Abbildung 68 dargestellt.



**Abbildung 68: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 5 mL/L dotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder.

Wie in Abbildung 68 an einer Wurzel in 5 mL/L dotierter Lösung gezeigt, kam es hier zu einer vollkommenen Zerstörung der gesamten Wurzel: Die Zellen verloren ihre definierten Formen und enthielten kein Plasma mehr, sichtbar an der gleichen Struktur inner- und außerhalb der Zellen. Selbst der Zentralzylinder im Inneren der Wurzel war kaum noch zu erkennen und völlig zerstört.

*Vergleich der Effekte der undotierten mit denen der dotierten IP21-Lösung*

Bei einem Vergleich der Wirkung der reinen Salzlösung mit der schwermetallhaltigen Testlösung wird deutlich, daß beide mit steigender Konzentration im Hydrokulturmedium auch stärkere Defekte an den Wurzeln verursachten, die gleichsam in beiden Fällen von der Wurzelperipherie ins Innere hin zunahmen. Allerdings war das Ausmaß der Zerstörung deutlich abhängig von der eingesetzten Testlösung. Die reine Salzlösung rief bei geringen Konzentrationen (0,5 mL/L) nur geringe Effekte hervor, während die schwermetallhaltige Salzlösung in dieser Konzentration bereits zur völligen Zerstörung der äußeren Zellschicht (Rhizodermis) führte. Entsprechend wiesen die inneren Zellschichten der Wurzeln in 5 mL/L Salzlösung noch keine sichtbaren Schäden auf, wohingegen selbst der Zentralzylinder der Wurzeln durch die mit Schwermetallen versetzte Salzlösung in der gleichen Konzentration bereits vollkommen zerstört wurde.

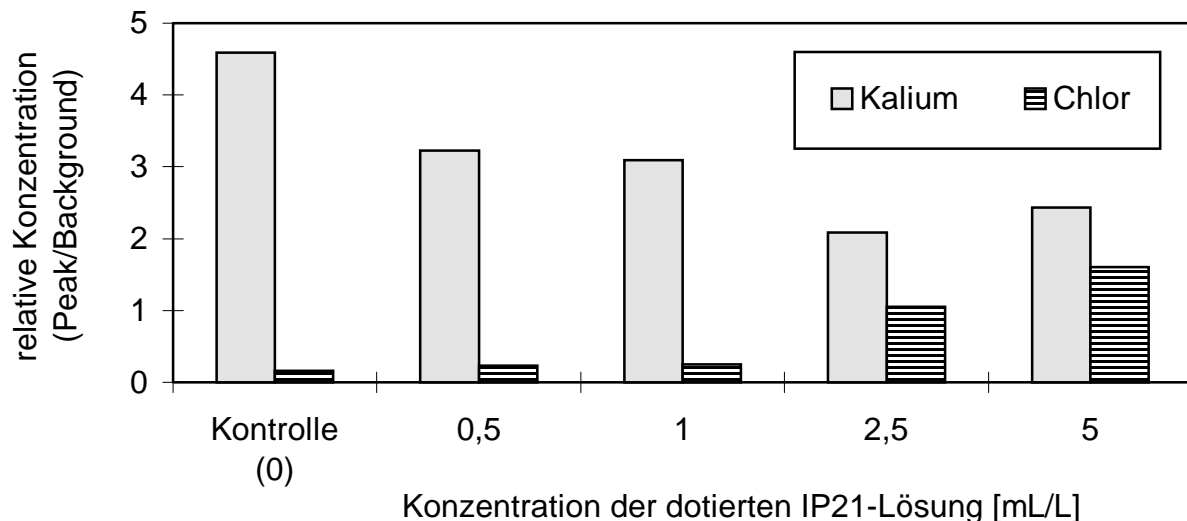
Eine weitere Unterscheidung in der Wirkung der beiden Testlösungen war die Ablösung des Plasmas von der Zellwand, die nur bei Einsatz der dotierten, jedoch niemals bei der undotierten IP21-Lösung, beobachtet wurde.

*EDX-Analysen*

Parallel zu den in diesem Kapitel dargestellten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Wurzeln erfolgten EDX-Analysen der Wurzelzellen. Mit dieser Meßmethode wurde die relative Konzentration von Kalium und Chlor innerhalb der Vakuolen der Wurzelzellen bestimmt. Die Kaliumkonzentration ist ein Indikator lebender und intakter Zellen: Je höher die Kaliumkonzentration desto größer die Vitalität der Zelle (LEIGH und WYN JONES 1984). Durch die Messung der relativen Chlorkonzentration kann das Verhältnis der Kalium- und Chlorkonzentration zueinander gebildet werden. Intakte Zellen enthalten hohe Kaliumkonzentrationen, jedoch nur geringe Chlorkonzentration. (Durchschnittlicher Gehalt an Kalium und Chlor in normal entwickelten Kulturpflanzen [ $\text{mmol} \cdot \text{kg Trockensubstanz}^{-1}$ ]: K: 250; Cl: 3. Aus MOHR und SCHOPFER 1992, nach EPSTEIN 1965.) Je höher die Chlorkonzentration im Verhältnis zur Kaliumkonzentration wird, desto weniger sind die Zellen noch zu aktiver Aufnahme und Selektion von Ionen fähig, d.h. desto stärker ist ihre Schädigung.

Die Bestimmung der Kalium- und Chlorkonzentration der einzelnen Wurzelgewebe erfolgte getrennt voneinander, so daß die Gehalte in der Rhizodermis von denen in

der Hypodermis usw. unterschieden werden konnten. In Abbildung 69 ist zunächst jedoch die Summe aus diesen Einzelmessungen der Wurzeln, die in der dotierten IP21-Lösung kultiviert wurden, dargestellt.



**Abbildung 69: Kalium- und Chlorkonzentration in den Vakuolen der Wurzeln von *Nicotiana tabacum*, nachdem diese 14 Wochen mit unterschiedlichen Konzentrationen einer schwermetallhaltigen Salzlösung (dotierte IP21) bzw. ohne Zusätze (Kontrolle) kultiviert wurden.**

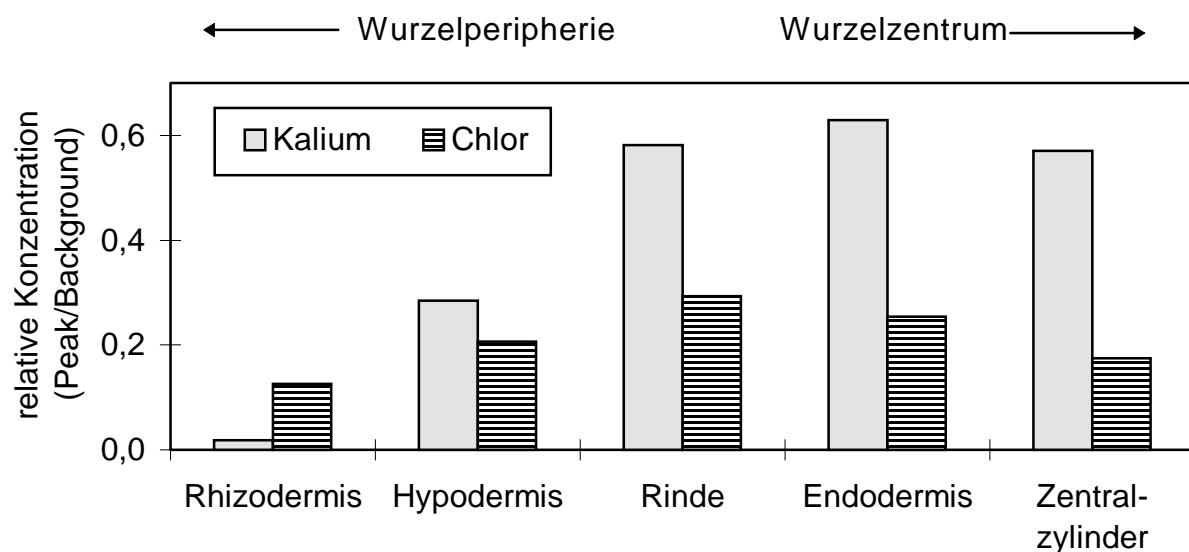
Kultivierung der Pflanzen und Zusammensetzung der Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Methode der EDX-Analysen: Kapitel 2.6.

Bereits bei einer Konzentration der dotierten IP21-Lösung von nur 0,5 mL/L war der Kaliumgehalt der Vakuolen gegenüber der Kontrolle deutlich gesunken. Mit höherer Dosierung der dotierten IP21-Lösung kam es zu einem weiteren Absinken der Kaliumkonzentration, obwohl das Kaliumangebot im Hydrokulturmedium stieg. (Die dotierte IP21-Lösung enthielt große Mengen an Kalium: mindestens 19.600 mg/L, 2.2.2.3, Tabelle 5.) Gleichzeitig stieg der Chlorgehalt in den Vakuolen, d.h. das Verhältnis Kalium zu Chlor sank zu Gunsten von Chlor. Beides ist eine Bestätigung der bereits anhand der Fotos gezeigten Zunahme der Schädigung der Zellen mit steigender Konzentration der Testlösung.

Von den Pflanzen, die unter Zusatz der undotierten IP21-Lösung kultiviert wurden, wurden nur die Wurzeln aus den Ansätzen mit 0,5 und 1 mL/L über die EDX-Analysentechnik untersucht. Bei diesen beiden Konzentrationen ergab sich wie im Falle der dotierten IP21-Lösung eine Abnahme der Kaliumkonzentration und des Kalium-Chlor-Verhältnisses mit steigender Dosierung der Testlösung.

Die Messungen der Kalium- und Chlorkonzentrationen in den Vakuolen der Wurzeln bestätigten die bereits in den Abbildungen 63 bis 68 dargestellten zunehmenden Zerstörungen der Wurzeln mit steigender Konzentration an Testlösungen.

Werden die Kalium- und Chlorkonzentrationen in den unterschiedlichen Geweben getrennt voneinander aufgetragen, so ergibt das in Abbildung 70 gezeigte Ergebnis. In dieser Abbildung sind die Meßwerte am Beispiel der Wurzeln aus 2,5 mL/L dotierter IP21-Lösung dargestellt.



**Abbildung 70: Kalium- und Chlorkonzentration der einzelnen Gewebe der Wurzeln von *Nicotiana tabacum*, nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen mit 2,5 mL/L schwermetalhaltigen Salzlösung (dotierte IP21).**

Kultivierung der Pflanzen und Zusammensetzung der Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Methode der EDX-Analysen: Kapitel 2.6.

Bei Berücksichtigung der Bestimmungsgrenze von 0,1 Relativen Einheiten war in der Rhizodermis praktisch kein Kalium nachzuweisen. Diese äußere Zellage war vollkommen zerstört. In der darauffolgenden Zellschicht, der Hypodermis, befand sich die Kaliumkonzentration bereits auf einem wesentlich höherem Niveau, d.h. daß diese Zellen weniger stark geschädigt waren. In den drei Meßzonen innerhalb der Wurzel (Rinde, Endodermis und Zentralzylinder) wurden etwa gleiche Kaliumkonzentration gemessen, die etwa doppelt so hoch waren wie in der Hypodermis. Dies belegt, daß diese Zellen eine höhere Vitalität aufwiesen als die Gewebe in der Wurzelperipherie. Über die Chlorkonzentration konnte aufgrund der geringen Veränderung zwischen den Meßzonen keine Aussage getroffen werden. Auch die

Wurzeln, die in der undotierten IP21-Lösung gewachsen waren, wiesen eine Abnahme der Vitalität von innen nach außen auf, angezeigt durch die abnehmende Kaliumkonzentration.

#### *Zusammenfassung*

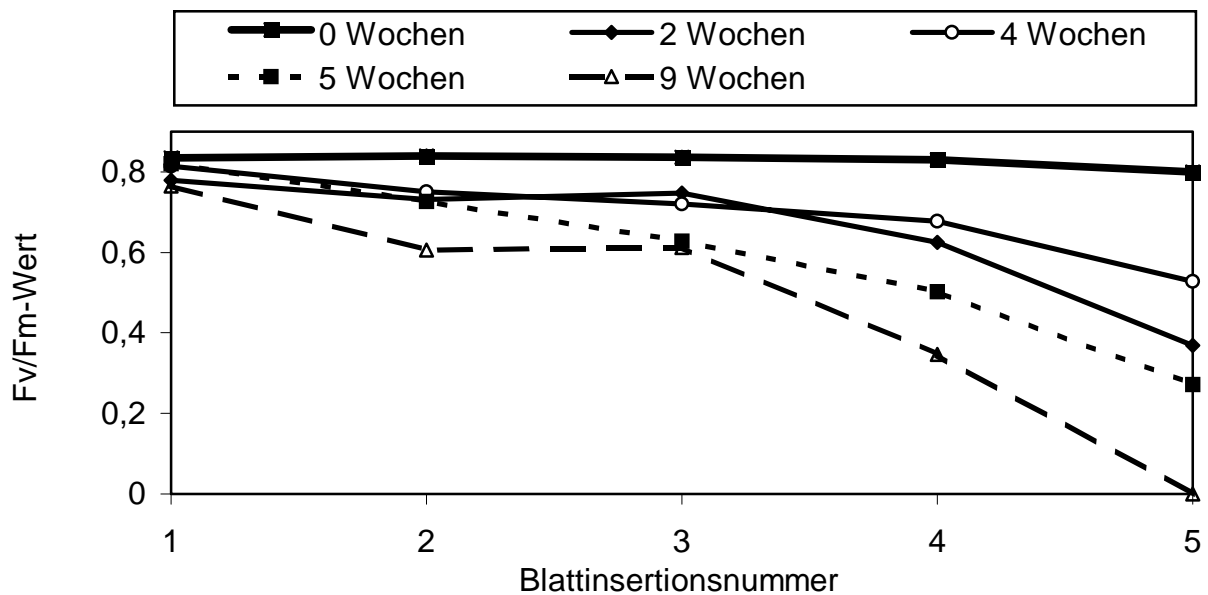
Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der EDX-Analysen die bereits an Hand der mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 63 bis 68 dargestellte zunehmende Zerstörung der Wurzeln von der Peripherie bis hin zum Zentralzylinder.

#### **3.3.3.5 Einfluß von Nährstoffmangel auf die Chlorophyllfluoreszenz von *Nicotiana***

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3.4 zeigen, daß die Wurzeln sowohl durch die reine Salzlösung als auch durch die mit Schwermetallen versetzten Testlösungen stark geschädigt wurden.

Wenn Wurzeln in einem derartigen Ausmaß geschädigt sind, können sie ihre Funktionen nicht mehr in vollem Umfang erfüllen. Wasser und diejenigen Ionen, die in der Nährlösung in hohen Konzentrationen enthalten sind, werden zwar auch bei defekten oder zerstörten Wurzeln noch durch das Xylem in die Blätter transportiert, es kann jedoch keine Selektion der aufgenommenen Ionen mehr stattfinden. Auch eine aktive Aufnahme von essentiellen Ionen, die nur in geringen Konzentrationen in der Nährlösung vorkommen, findet nicht mehr statt. Dies läßt die Vermutung zu, daß einer der Gründe, die zu der Hemmung der Photosynthese dieser Pflanzen führten, auf einem Nährstoffmangel basierte, der durch die eingeschränkte Wurzelfunktion hervorgerufen wurde. Die weiteren möglichen Ursachen der Beeinträchtigung der Photosynthese durch unterschiedliche Effekte von Salzen und Schwermetallen werden in der Diskussion erläutert (Kapitel 4.4).

Um zu überprüfen, ob ein Nährstoffmangel sich tatsächlich auf die Photosynthese, bzw. die Chlorophyllfluoreszenz, in der beschriebenen Weise auswirkt, wurde ein solcher Nährstoffmangel simuliert und während dessen der Vitalitätsindex  $F_v/F_m$  aller Blätter bestimmt. Die Tabakpflanzen wurden dazu in deionisiertes Wasser umgesetzt und 9 Wochen darin kultiviert. Während dieser Zeit konnten von den Wurzeln praktisch keine weiteren Nährstoffe aufgenommen werden. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 71 dargestellt.



**Abbildung 71: Veränderung des Fv/Fm-Wertes der Blätter von *Nicotiana* durch Kultivierung der Pflanzen in deionisiertem Wasser ohne Nährstoffzufuhr.**

Junge *Nicotiana*-Pflanzen im Fünfblattstadium wurden aus einer Welch-Nährlösung (Kapitel 2.1.2, Tabelle 1) in deionisiertes Wasser gegeben und 9 Wochen ohne Nährstoffzufuhr darin kultiviert. Die Messung der Fv/Fm-Werte erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 angegeben.

Die Pflanzen wuchsen nach dem Wechsel in das deionisierte Wasser nicht mehr, d.h. das Blatt mit z.B. der Insertionsnummer zwei blieb über den Versuchszeitraum auch Nr. zwei.

In dem Hydrokulturmedium noch mit Nährstoffen versorgt (0. Woche), wiesen die Blätter der Pflanzen eine uneingeschränkte Photosyntheseleistung auf. Dies zeigte der Fv/Fm-Wert von über 0,8. Nachdem die Pflanzen 2 Wochen ohne Nährstoffzufuhr in deionisiertem Wasser kultiviert worden waren, kam es bereits zu einer deutlichen Reduktion der Fv/Fm-Werte, wobei die Blätter an der Sproßspitze am wenigsten betroffen waren. Der Vitalitätsindex der Blätter nahm zur Sproßbasis hin ab. Dieser Effekt setzte sich mit andauerndem Nährstoffmangel in den folgenden Versuchswochen fort: Das erste an der Sproßspitze inserierte Blatt zeigte kaum eine Reduzierung seines Vitalitätsindexes, während der der übrigen Blätter mit zunehmender Blattinsertionsnummer immer stärker abnahm.

Diese Daten zeigen, daß sich wie erwartet ein Nährstoffmangel auf das Wachstum und die Photosyntheseleistung der Tabakpflanzen auswirkte, und daß dieser Einfluß

auf die Photosynthese mit Hilfe der Messung der Chlorophyllfluoreszenz erfaßt werden konnte.

Aus dem Ergebnis dieses Versuches kann gefolgert werden, daß die in den Blättern der Tabakpflanzen mit der Chlorophyllfluoreszenz detektierte Hemmung der Photosyntheseleistung (Kapitel 3.3.3.1) unter anderem auf die Zerstörung der Wurzel und daraus folgendem Nährstoffmangel zurückzuführen ist.

Weitere Ursachen für die Hemmung der Photosynthese durch Salze und Schwermetalle werden in der Diskussion (Kapitel 4.4) aufgeführt.



#### 4 Diskussion

Die Abfälle, die sowohl in der industriellen Fertigung als auch im privaten Haushalt entstehen, müssen in geeigneter Weise entsorgt werden. Hierfür existieren verschiedene rechtliche Vorschriften. In der Verwaltungsvorschrift TA Abfall werden u.a. die Anforderungen für die Einlagerung von besonders überwachungsbedürftigen Abfällen untertage in vorhandenen offenen Hohlräumen beschrieben. In Deutschland werden entsprechende Untertagedeponien zur Zeit ausschließlich in aufgelassenen Salzbergwerken betrieben. Die zur Risikoabschätzung vorgenommenen "worst case Szenarien" mit Untersuchungen zu Wirkungen der entstehenden Abfalleluate auf verschiedene Testorganismen müssen aus diesem Grund auch auf die salinen Untertagedeponien ausgerichtet sein.

Dies führt dazu, daß zur Elution der Abfälle Salzlaugen eingesetzt werden müssen. Bei der Auswahl der anschließend durchgeführten Ökotoxizitätstests muß beachtet werden, daß nicht nur die eluierten Schwermetalle aus den Abfällen, sondern auch das Salz des Elutionsmittels, auf viele Organismen eine Hemmung ausübt. Die Wirkung des Salzes darf nicht so groß sein, daß sie die Toxizität der Schwermetalle überlagert. Eine Erfassung der hemmenden Eigenschaften der Salze ist nicht das Ziel der Ökotoxizitätstests, da diese auf die natürlichen Salzlagerstätten zurückgeht, bzw. die Salzkonzentration in der Biosphäre im Laufe der Zeit sehr stark verdünnt wird.

Zur Beurteilung der Eignung von Ökotoxizitätstests muß daher immer die Salztoleranz des in diesem Test eingesetzten Organismus überprüft werden. Dies geschieht durch einen Vergleich der Wirkung der reinen Salzlaugen mit den Effekten der Eluate.

In früheren Studien wurde die Wirkung des Salzes auf einige Testorganismen nicht berücksichtigt. WUNDRAM (1995) bzw. WUNDRAM et al. (1996) betrachteten in Phytotoxizitätstests mit *Lemna* und *Lepidium* erstmals neben der Toxizität von Schwermetallen auch den Salzeffekt, indem sowohl eine Salzlösung als auch eine mit einem Schwermetallgemisch versetzte Salzlösung eingesetzt wurde. Bei diesen Untersuchungen konnte nicht zwischen der Hemmung des Salzes und der Schwermetalle unterschieden werden. Aus diesem Grund wurde in WUNDRAM (1995) bzw. WUNDRAM et al. (1996) ein neuer Test auf der Basis der Photosynthese von

*Chlamydomonas* zur Untersuchung der Phytotoxizität von salinen Abfalleluaten vorgeschlagen.

Diese ersten Studien zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten wurden nur an Salzlösungen, denen künstlich Schwermetalle zugesetzt wurden, vorgenommen. Zur Absicherung der in den genannten Untersuchungen erzielten Ergebnisse wurden in dieser Arbeit Tests mit salinen Eluaten von authentischen Abfällen durchgeführt. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse aus WUNDRAM (1995) bzw. WUNDRAM et al. (1996): *Lepidium* und *Lemna* sind wegen ihrer großem Salzempfindlichkeit nicht zur Beurteilung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten geeignet. Mit der wenig salzempfindlichen Grünalge *Chlamydomonas* wurde hingegen die Toxizität der Schwermetalle erfaßt, da hier eine deutliche Unterscheidung zwischen Salz- und Schwermetalleffekt erreicht wurde.

Wie bereits bei *Lemna* und *Lepidium* erwies sich die Wirkung der reinen Salzlauge auch bei den weiteren erprobten Phytotoxizitätstests (terrestrischer Pflanzenwachstumstest und Zellkultur-Test mit Tabak-Suspensionskulturen) als so gravierend, daß die Toxizität der Schwermetalle hiervon überlagert wurde. Aus diesem Grund sind diese Tests ungeeignet, um die Ökotoxizität von salinen Abfalleluaten zu bestimmen.

Diese Testorganismen dürfen nicht zur Bewertung der Toxizität von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten eingesetzt werden, da es sonst zu falschen Beurteilungen aufgrund einer Überbewertung der Toxizität dieser Eluate durch die hohe Salzkonzentration kommen könnte.

Diese Ergebnisse belegen nachdrücklich, daß nicht jedes Testverfahren zur Bewertung einer Probe geeignet ist. Eine sorgfältige Überprüfung der Testergebnisse im Vergleich mit entsprechenden Kontrollexperimenten ist unabdingbar um Fehlinterpretationen zu verhindern.

Von den erprobten Standard-Phytotoxizitätstest erwies sich lediglich der *Chlamydomonas*-FDA-Test als sehr salzunempfindlich und erlaubte somit neben dem neu entwickelten *Chlamydomonas*-Photosynthesetest als einziger die Beurteilung der Schwermetalleffekte der meisten IP-Eluate ohne Überlagerung der Hemmung des Salzes.

#### 4.1 Ist mit *Chlamydomonas* eine Detektion der Schwermetalle möglich?

Die beiden Phytotoxizitätstests mit der Grünalge *Chlamydomonas* (Photosynthesetest und FDA-Test) ermöglichten als einzige Verfahren die Bewertung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten, da mit ihnen eine Trennung der hemmenden Wirkung der Salzlauge von der Toxizität der Schwermetalle erreicht wurde (Kapitel 3.2.1.4 und 3.2.2.4).

Für eine weitergehende Validierung dieser Tests ist es jedoch notwendig, ihre Verlässlichkeit zur Detektion von toxischen Schwermetallen in einer Testlösung zu prüfen. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, daß das Ergebnis des Phytotoxizitätstests ein Eluat als nicht oder nur gering toxisch einstuft, obwohl mit einer chemischen Elementanalytik hohe Schwermetallkonzentrationen in dieser Probe nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der mit dem Photosynthesetest und dem FDA-Test erzielten  $EC_{50}$ -Werte aller untersuchten Eluate mit ihren Schwermetallgehalten zeigt, daß alle Eluate mit signifikanten Schwermetallkonzentrationen (Anhang: Tabellen A11-A13) ebenfalls entsprechende toxische Wirkungen auf die Testsorganismen ausübten. In den Fällen, in denen sehr hohe  $EC_{50}$ -Werte ermittelt wurden (157-GW und 158-GW), konnten in den Eluaten außer sehr geringen Chromkonzentrationen (unter 1 mg/L) auch keine weiteren Schwermetalle oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden.

Dies belegt, daß sowohl der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest als auch der *Chlamydomonas*-FDA-Test verlässliche Methoden zur Bestimmung der Toxizität von komplexen Testlösungen sind.

Die Notwendigkeit von Phytotoxizitätstests zur Bewertung von komplexen Abfalleluaten und ihre Leistungsfähigkeiten werden durch die Fälle besonders deutlich, in denen die chemische Analytik keine oder nur geringe Schwermetallgehalte nachweist, die Eluate aber dennoch deutlich toxisch auf Organismen reagieren. Ein Beispiel hierfür ist das Eluat 157-IP9, in dem keine Schwermetalle oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden konnten. Dennoch erwies es sich im *Chlamydomonas*-FDA-Test als deutlich toxisch.

Dieses Beispiel zeigt, daß eine Bewertung der Toxizität von komplexen Abfalleluaten auf Basis der chemischen Analyse der tatsächlichen Wirkung dieser Lösungen auf Organismen nicht immer gerecht wird, da hierbei u.a. die vielfachen Wechselwirkungen der Inhaltsstoffe der Eluate nicht berücksichtigt werden. Gerade diese Wechselwirkungen spielen jedoch zusammen mit weiteren Faktoren (z.B. der Speziation der Schwermetalle) bei der Ausprägung der Toxizität eine wichtige Rolle. So fanden GABBRIELLI und PANDOLFINI (1984) und KÖRNER et al. (1987), daß Ca und/oder Mg die Toxizität von Schwermetallen mindern können. Auch PELLEGRINI et al. (1993) sprachen von einem Antagonismus zwischen Ca und der Cd- bzw. Cu-Toxizität. Sie fanden aber auch einen Synergismus zwischen Ca und der Zn-Toxizität. Die Toxizität ist aber nicht nur von der Konzentration einer einzelnen Komponente, wie der Ca-Konzentration, abhängig, sondern kann überdies auch unspezifisch vom Salzgehalt beeinflusst werden. FREY et al. (1983) (cit. ex. COWGILL et al. 1991) stellten fest, daß die Sensibilität von Phytoplankton gegenüber  $\text{Cr}^{\text{IV}}$  in Süßwasser mit steigendem Salzgehalt sinkt. Aber auch die Sulfatkonzentration kann die Toxizität von  $\text{Cr}^{\text{IV}}$  beeinflussen: RIEDEL (1984) (cit. ex. COWGILL et al. 1991) schrieb, daß die Toxizität von  $\text{Cr}^{\text{IV}}$  vom Verhältnis  $\text{Cr}^{\text{IV}}/\text{SO}_4$  abhängt, basierend auf einer kompetitiven Bindung von  $\text{Cr}^{\text{IV}}$  und Sulfat an eine bestimmte ungenannte Stelle.

Weiterhin kann sich auch die Form des Stickstoffangebotes ( $\text{NH}_4^+$  oder  $\text{NO}_3^-$ ) auf die Schwermetallaufnahme auswirken: FLORIJN et al. (1992) berichteten über eine höhere Cd- und Zn-Konzentration in *Lactuca sativa* nach Kultivierung mit  $\text{NH}_4^+$  als in solchen Pflanzen, die mit  $\text{NO}_3^-$  als Stickstoffquelle angezogen wurden.

WONG und BEAVER (1980) machten Experimente zur Toxizität von Cu auf die Grünalge *Chlorella*. Sie stellten fest, daß Kupfer nach Zusatz einer Lösung aus verschiedenen anderen Metallen das Algenwachstum weniger stark hemmt als ohne Zusatz dieser "mixed-metal solution". Sie folgerten daraus, daß die mögliche Schädigung durch ein Schwermetall nicht gemäß seiner Konzentration im Medium, sondern nach seinem Verhältnis zu anderen Metallen beurteilt werden sollte.

Neben diesen Einflußfaktoren auf die Toxizität von Schwermetallen spielen in der Ausprägung ihrer Wirkung auf Organismen auch noch Interaktionen zwischen den jeweils vorhandenen Schwermetallen eine wichtige Rolle. VAN COLLIE et al. (1983) fanden einen Antagonismus zwischen Cu, Ni, Cr und Zn: Die Summe der Toxizitäten der einzelnen Schwermetalle überstieg die Toxizität ihres Gemisches. Auch andere

Autoren berichteten von derartigen Ergebnissen. So erhielten HUTCHINSON und STOKES (1975) (cit. ex. WONG und BEAVER 1980) sowohl synergistische Wirkungen zweier Schwermetalle (Cu und Ni) als auch antagonistische (Cd und Se). PELLEGRINI et al. (1993) beschrieben die Wirkung von Cd und Zn abhängig von ihrer exogenen Konzentration als antagonistisch oder synergistisch und stellten eine synergistische Wirkung von Cd und Cu fest.

Weiterhin liefert die chemische Analyse nur Daten zur Konzentration einer Substanz, z.B. eines Schwermetalles, in einer Testlösung. Sie ermöglicht jedoch keine Aussagen zur physiko-chemischen Form oder Speziation dieses Schwermetalles in der Probe, von der die Toxizität der Schwermetalle in hohem Maße anhängen kann (QIAO und HO 1996). Dies bedeutet, daß eine bestimmte Konzentration eines Schwermetalles in der einen Lösung in bioverfügbarer und toxischer Form vorliegt, während das Schwermetall in einer zweiten Lösung zwar in der gleichen Konzentration vorliegt, jedoch nicht bioverfügbar und somit auch nicht toxisch wirkt.

Die obigen Ausführungen haben gezeigt, daß eine Vorhersage der Toxizität der Eluate anhand der chemischen Elementanalyse nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Die tatsächliche Toxizität auf Organismen wird durch zu viele andere Parameter bestimmt, die von der invasiven chemischen Analyse nicht erfaßt werden können. Dieser Umstand macht die Anwendung von verschiedenen Ökotoxizitätstests zur Beurteilung der Wirkung von Abfalleluaten unentbehrlich und demonstriert die Leistungsfähigkeit der Ökotoxizitätstests, die anders als die chemische Analyse all diese vielfältigen Einflußfaktoren erfassen.

Hierbei darf jedoch nicht vergessen werden, daß die chemische Analyse parallel zu Ökotoxizitätstests dennoch sinnvoll und notwendig ist, da mit ihr auch Hinweise zur Konzentration von Schadstoffen erlangt werden können, die nicht bioverfügbar sind und als solche auch nicht mit den Ökotoxizitätstests erfaßt werden können. Diese Substanzen könnten aber dennoch, z.B. nach einer Veränderung ihrer Speziation, toxisch wirksam werden. Zudem ermöglicht die chemische Analyse es, zu klären, welche Ionen die Schädigung potentiell verursachen und die toxische Wirkung der Testlösung ausmachen.

## 4.2 Überprüfung der Verlässlichkeit des *Chlamydomonas*-Photosynthesetests

Der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest erwies sich als geeigneter Test zur Bestimmung der toxischen Wirkung der Schwermetalle in den salinen Abfalleluaten. Zur Überprüfung der Verlässlichkeit des *Chlamydomonas*-Photosynthesetests wurde dieser neue Phytotoxizitätstest jedoch noch mit den bereits für nicht saline Testlösungen bewährten Standard-Phytotoxizitätstests mit *Lemna* und *Lepidium* verglichen.

Für diesen Vergleich konnten nicht die Untersuchungen an den salinen Abfalleluaten herangezogen werden, da *Lemna* und *Lepidium*, wie bereits beschrieben, nicht zur Bewertung dieser Lösungen geeignet sind. Aus diesem Grund wurden die von den Abfällen hergestellten Eluate auf der Basis von Grundwasser eingesetzt. Diese Eluate ähnelten in ihrer Zusammensetzung den salinen Eluaten auf Basis der Salzlauge, enthielten jedoch keine hohen Salzkonzentrationen, so daß die salzempfindlichen Testorganismen *Lemna* und *Lepidium* eingesetzt werden konnten.

Im Vergleich mit den Ergebnissen aller durchgeführten Tests (Kapitel 3.2.5.1) stellte sich zwar *Lemna* als der empfindlichste Organismus heraus, doch auch der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest erwies sich als sehr sensibel. In allen Fällen konnte mit ihm ein geringerer EC<sub>50</sub>-Wert als mit dem *Lepidium*-Wurzellängentest ermittelt werden.

Der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest wies somit eine mittlere Empfindlichkeit auf, die es erlaubte, die toxischen Wirkungen aller Eluate zu erfassen, die gleichzeitig jedoch nicht zu hoch war, so daß eine unerwünschte Überbewertung der Toxizität eines Eluates ausgeschlossen werden konnte.

Dies bestätigt, daß sich der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest zur Beurteilung verschiedenster toxischer Abfalleluate eignet.

#### 4.3 Bewertung der Ergebnisse der Ökotoxizitätstests mit *Chlamydomonas*, *Lemna* und *Lepidium*

Der Vergleich der Ergebnisse aller Tests mit den Grundwassereluataten hat auch gezeigt, daß trotz der völligen Unbrauchbarkeit von *Lemna* zur Bewertung der Salzlaugeneluate dieser Organismus zurecht als Standardtest für viele verschiedene salzarme Testlösungen eingesetzt werden kann.

Die große Empfindlichkeit von *Lemna* bestätigten auch GROSSMANN et al. (1992), die die Wirkung verschiedener Pflanzenwachstumshemmer und Herbizide auf eine Mais-Zellkultur, Grünalgen, *Lemna* und *Lepidium* untersuchten. Auch in ihren Tests erwies sich *Lemna* vor den Grünalgen als der empfindlichste Test. Allerdings setzten die Autoren in ihren Untersuchungen *Lemna paucicostata* ein. PETERSON et al. (1994) testeten die Phytotoxizität von Pestiziden auf Diatomeen, Grünalgen, Cyanobakterien und *Lemna minor*, und auch in diesem Fall erwies sich *Lemna* als empfindlichster Organismus. *Lemna* wurde nicht nur in Tests mit einzelnen organischen Substanzen (Herbiziden oder Pestiziden), sondern auch mit komplex zusammengesetzten Lösungen untersucht: In den Tests von TARALDSEN und NORBERG-KING (1990) mit Industrie- und Kläranlagenabwässern stellte sich *Lemna* im Vergleich mit *Ceriodaphnia dubia* und Elritzen (*Pimephales promelas*) ebenfalls als der empfindlichste Organismus heraus. Ebenso konnten WANG und WILLIAMS (1990) an komplexen Sickerwässern zeigen, daß Wasserlinsen empfindlicher reagierten als die höheren Landpflanzen Kohl und Rispenhirse. Darüber hinaus stellten SALLENAVE und FOMIN (1997) die sehr gute Eignung einer anderen Wasserlinsengattung, *Spirodela polyrhiza*, zur Bestimmung der Phytotoxizität von Deponiesickerwässern fest.

Im Gegensatz zu den oben zitierten Arbeiten und den Daten aus dieser Arbeit stellten sich in anderen Untersuchungen Algen als die empfindlichsten Testorganismen heraus. COWGILL et al. (1991) verglichen die Sensibilität von verschiedenen *Lemna minor* Klonen und *Lemna gibba* mit der von Diatomeen, Daphnien, Fischen und Grünalgen gegenüber acht verschiedenen Chemikalien (u.a.  $K_2Cr_2O_7$  oder Phenol). Ihre Ergebnisse zeigten eine deutlich größere Empfindlichkeit der Grünalgen verglichen mit *Lemna*.

In den Untersuchungen von THOMAS et al. (1986) (cit. ex. WUNCHENG 1991) über die Wirkungen von Einzelchemikalien, Metallionen und Insektiziden auf Mikroorganismen, höhere Pflanzen, Regenwürmer und Grünalgen erwiesen sich ebenfalls die Algen als die empfindlichsten Organismen. Auch in Studien über die Toxizität von Deponiesickerwässern auf Bakterien (MIKROTOX™), Daphnien und Grünalgen (LAMBOLEZ et al. 1994) zeigte sich, daß Testlösungen am stärksten auf die Algen wirkten. Eine deutlich höhere Empfindlichkeit von Algen verglichen mit Bakterien (MIKROTOX™) und Daphnien stellten auch KÄLLQVIST et al. (1989) in ihren Untersuchungen von Industrieabwässern fest.

Diese zahlreichen Untersuchungen belegen, daß sowohl Grünalgen als auch *Lemna* sich sehr gut als Organismen für Phytotoxizitätstests zur Beurteilung verschiedenster toxischer Proben eignen. Diese Arbeiten zeigen jedoch auch, daß trotz der großen Empfindlichkeit eines Organismus in einigen Untersuchungen, dieser bei anderen Testsubstanzen eine geringere Sensibilität aufweisen kann: Es existiert nie der empfindlichste Test für alle Proben. Auch dies zählt zu den Einschränkungen der Leistungsfähigkeiten von Ökotoxizitätstests.

Die variierenden Empfindlichkeiten der Tests mit *Lemna* und *Chlamydomonas* machen deutlich, daß es zur fundierten Beurteilung der möglichen toxischen Wirkungen eines Abfalles nicht ausreicht, nur diese beiden Methoden oder gar nur eine von beiden durchzuführen. Die Diversität der Proben und die häufige Unkenntnis über die Inhaltsstoffe macht eine gleichzeitige Anwendung mehrerer Tests notwendig.

Bei der Beurteilung der Proben kommt es darüber hinaus nicht nur auf die Wirkung auf den empfindlichsten Organismus an, vielmehr soll eine umfassende Aussage über die möglichen Effekte der Probe auf die Biosphäre getroffen werden. Hierzu ist die Anwendung vieler verschiedener Tests mit tierischen und pflanzlichen Organismen aus unterschiedlichen Trophieebenen die Voraussetzung.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an den Grundwassereluatens zeigen darüber hinaus, daß nicht von der Toxizität gegenüber einem Organismus auf die Auswirkung auf einen anderen geschlossen werden kann. Die Reaktion einer toxischen Probe kann sich auf unterschiedliche Organismen deutlich unterscheiden.



So unterschieden sich die mit unterschiedlichen Organismen ermittelten EC<sub>50</sub>-Wert einiger Eluate z.B. um den Faktor 100. Auch in anderen Arbeiten wurde auf die Notwendigkeit, viele Tests durchzuführen, hingewiesen, weil sich Organismen in ihrer Reaktion auf Substanzen unterscheiden können. DEVARE und BAHADIR (1994) berichteten von unterschiedlicher Sensibilität verschiedener Organismen auf die Wirkung von Deponie-Sickerwässern. Auch COWGILL et al. (1991) und ARAMBASIC et al. (1995) stellten verschiedene Sensibilitäten der eingesetzten Testorganismen auf die untersuchten Proben fest.

Aus diesen Gründen reicht die Bewertung der salinen UTD-relevanten Abfalleluate allein auf der Basis von Tests mit *Chlamydomonas* nicht aus. Vielmehr wird noch mindestens eine weitere Methode mit einer höheren Pflanze als Testorganismus benötigt, um zu gesicherten Aussagen zu gelangen. Daher wurde untersucht, ob sich die Messung der Chlorophyllfluoreszenz von Tabakpflanzen in diesem Zusammenhang als neuer Phytotoxizitätstest eignet.

#### **4.4 Untersuchungen mit *Nicotiana tabacum***

Die Ergebnisse der Untersuchung aller authentischen Grundwassereluate mit vier verschiedenen Testverfahren (Kapitel 3.2.5.1) wurden im vorangegangenen Kapitel verglichen. Hierbei ergaben sich z.T. große Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen. Die Differenzen sind auf die unterschiedlichen Wirkweisen der Eluate zurückzuführen, die sich bei den verschiedenen Organismen unterscheiden. Mit dem *Chlamydomonas*-Photosynthesetest kann zwar die direkte Einwirkung der Eluate auf die Photosynthese erfaßt werden, Auswirkungen auf Langstreckentransportprozesse oder die Funktion der Wurzel werden mit diesem Test jedoch nicht erfaßt. Umgekehrt kann mit dem *Lepidium*-Test z.B. keine direkte Beeinflussung der Photosynthese detektiert werden. Somit kann mit keinem der eingesetzten Testverfahren jede mögliche Art der Schädigung ermittelt werden.

Um die möglichen Ursachen für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der eingesetzten Tests auf die Eluate aufzuzeigen, wurde die Wirkung der Eluate auf Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*), als Modellsystem für höhere Landpflanzen, mit verschiedenen pflanzenphysiologischen Methoden untersucht (Kapitel 3.3). Dabei wurden sowohl die möglichen direkten Beeinträchtigungen des Photosynthesapparates durch die Testlösungen als auch diejenigen Wirkungen, die z.B. durch

Schädigung der Wurzeln einen sekundären Einfluß auf die Photosynthese ausüben, betrachtet. Die Ergebnisse hierzu werden im Folgenden diskutiert.

Parallel zur Analyse der Wirkungsmechanismen wurde überprüft, ob sich die Messung der Chlorophyllfluoreszenz an den Tabakpflanzen als neuer Test zur Bewertung von UTD-relevanten Abfalleluaten eignet. Die Diskussion hierzu (Kapitel 4.5) kann erst nach den Ausführungen zu den Effekten der Testlösungen auf die Tabakpflanzen erfolgen, da deren Kenntnis die Voraussetzung für die Entscheidung zur Eignung der Chlorophyllfluoreszenz als Basis für einen Phytotoxizitätstest darstellt.

#### **4.4.1 Direkte Schädigungen des Photosyntheseapparates**

##### **4.4.1.1 Schwermetallkonzentrationen im Gewebe**

Bei der Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Schwermetalle aus den Eluaten war zu klären, ob in höheren Pflanzen eine direkte Schädigung des Photosyntheseapparates in den Blättern möglich ist. Im Falle der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas* wurde dies durch die Experimente mit den Grundwassereluaten belegt. Ob die Schwermetalle in den Testlösungen auch bei höheren Pflanzen zu einer direkten Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates führen können, wurde durch die Tests mit *Lemna* und *Lepidium* nicht gezeigt. Die wichtigste Voraussetzung hierfür stellt die Aufnahme in die Pflanze und der Transport der Schwermetalle in die Blätter dar, denn nur dann kann von ihnen ein Einfluß auf die Photosynthese ausgehen. Um einen möglichen direkten Einfluß der Schwermetalle auf den Photosyntheseapparat zu untersuchen, wurden die Schwermetallgehalte in den einzelnen Organen der Tabakpflanzen als Modellsystem für höhere Pflanzen ermittelt.

Tatsächlich ergab diese Analyse, daß signifikante Mengen an Kupfer und Zink in die Tabakblätter transportiert wurden, obgleich größere Mengen dieser beiden Schwermetalle in den Wurzeln zurückgehalten wurden (Kapitel 3.3.2.1). Dies ist u.a. mit der hohen Affinität dieser Schwermetalle gegenüber der Zellwand der Wurzeln zu erklären (ALLAN und JARELL 1989).

Daneben wurden auch hohe Cadmiumkonzentrationen sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln der Pflanzen gefunden. Dieses Ergebnis wurde von WAGNER et al. (1988) bestätigt, die auch die Aufnahme von Cd in *Nicotiana tabacum*

untersuchten und hier eine hohe Akkumulation sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln bestimmten. Nach ihren Untersuchungen wird die Verlagerung von Cadmium in den Sproß und damit auch die Akkumulation in den Blättern durch die Wurzeln kontrolliert.

Nur Blei wurde nicht in die Blätter aufgenommen, sondern in den Wurzeln zurückgehalten. Blei besitzt eine große Affinität zu Zellwand-Pektinen und wird aus diesem Grund bereits in den Wurzeln vieler Pflanzen zurückgehalten (SIEGHARDT 1987, SALIM et al. 1993).

Diese Untersuchungen belegen, daß Schwermetalle in den Blättern in potentiell wirksamen Konzentrationen enthalten waren und somit einen negativen Effekt auf die Photosynthese der Tabakpflanzen verursachen konnten. Daß Schwermetalle prinzipiell einen negativen Einfluß auf den Photosyntheseapparat ausüben können, wenn sie in Kontakt mit diesem treten können, wurde bereits in anderen Forschungsarbeiten bewiesen. So gibt es Untersuchungen zur genauen Position, an der Kupfer die Photosynthese hemmt: YRUELA et al. (1992 und 1993) fanden heraus, daß Kupfer den photosynthetischen Elektronentransport zwischen Pheophytin und  $Q_A$  hemmt, indem Kupfer an Aminosäuren in Reaktionszentren in diesem Abschnitt der Elektronentransportkette bindet. Auch die Ursachen der Wirkung von Cadmium auf die Photosynthese wurden in einer Reihe von Untersuchungen aufgeklärt (PRASAD 1995). LI und MILES stellten bereits 1975 fest, daß Cadmium direkt auf die Photosystem II Photoreaktion einwirkt und nicht auf das Elektronentransportsystem nahe des wasserspaltenden Komplexes, wie vorher angenommen wurde. Cadmium wirkt jedoch auch auf andere Bereiche der Photosynthese: es übt einen Effekt auf den Calvin Zyklus aus (WEIGEL 1985, SHEORAN et al. 1990) und hemmt die zyklische und nicht-zyklische Photophosphorylierung (STIBOROVA et al. 1986). Die Toxizität des Cadmium beruht jedoch auch auf Membranzerstörungen und der Inaktivierung von Enzymen durch Reaktionen mit ihren SH-Gruppen (FÜHRER 1982). Zu diesen Enzymen gehören auch solche mit einer zentralen Position im photosynthetischen Metabolismus wie die Rubisco (SHOERAN et al. 1990).

Ebenso wirken sich Nickel und Zink hemmend auf die Rubisco-Aktivität aus. Allerdings kommt es hier nicht zu Reaktionen mit den SH-Gruppen wie bei Cadmium, sondern zur Substitution von Magnesium durch die Schwermetalle (VAN ASCHE und CLIJSTERS 1986).

Diese Literaturhinweise über die prinzipiellen Mechanismen der Schädigung des Photosyntheseapparates durch Schwermetalle zusammen mit dem in dieser Arbeit erbrachten experimentellen Befund, daß tatsächlich Schwermetalle in die Blätter von *Nicotiana* aufgenommen worden sind, führen zur Schlußfolgerung, daß auch die Schwermetalle der Abfalleluate einen direkten Einfluß auf die Photosynthese ausüben konnten. Hieraus ergibt sich, daß der Wirkungsmechanismus der Testlösungen nicht nur bei *Chlamydomonas*, sondern auch bei höheren Pflanzen u.a. auf einer direkten Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates durch die Schwermetalle beruhte. Dies schließt jedoch weitere Wirkweisen der Testlösungen nicht aus. Diese werden im Folgenden diskutiert.

#### **4.4.1.2 Auswirkungen von Salzstreß**

Aufgrund der teilweise hohen Konzentration der nachweislich auf die Photosynthese toxisch wirkenden Schwermetalle Cadmium, Kupfer, Nickel und Zink in den Tabakblättern, kann davon ausgegangen werden, daß diese Schadstoffe zur Veränderung der Chlorophyllfluoreszenz Daten beitrugen. Dennoch kann der gleichzeitige Einfluß anderer Parameter nicht ausgeschlossen werden. Hierfür spricht die Tatsache, daß auch die in der undotierten Salzlösung kultivierten Pflanzen einen Rückgang der Photosyntheseaktivität aufwiesen. Da diese Pflanzen ohne Schwermetalldotierung kultiviert wurden, muß die Ursache für diese Hemmung der Photosynthese allein in der Wirkung der in der IP21-Lösung enthaltenen Salze begründet sein.

Die Quantifizierung von Bestandteilen der reinen IP21-Lösung, wie z.B. Mg und Na, in den Tabakpflanzen zeigte, daß große Mengen der Salze in die Blättern gelangten (Kapitel 3.3.2.2). Auch wenn es zumindest nach der vierten Woche nur im Fall von Magnesium zu einer Akkumulation in den Blättern kam, kann doch von diesen aufgenommenen Ionen eine Schädigung auf die Photosynthese ausgehen. Dies bestätigten zahlreiche andere Autoren (DOWNTON 1977, SEEMAN und CRITCHLEY 1985, YEO et al. 1985). Salzstreß verursacht zum einen durch den osmotischen Einfluß einen physiologischen Trockenheitseffekt, d.h. eine geringere Verfügbarkeit des Wassers in der Salzlösung verglichen mit reinem Wasser. Zum anderen gehen von den aufgenommenen Salzionen auch direkte hemmende Wirkungen aus. FEDINA et al. (1994) zeigten an isolierten Protoplasten von Erbsenkeimlingen einen direkten

hemmenden Einfluß von Salzstreß (NaCl) auf die Photosynthese in Form einer reduzierten CO<sub>2</sub>-Fixierung. BETHKE und DREW (1992) stellten einen Rückgang der Photosyntheseaktivität in Blättern von *Capsicum annuum* durch NaCl-Salzstreß fest. HAMADA und EL-ENANY (1994) verzeichneten zwar eine Stimulierung der Photosyntheseaktivität von Erbsen bei geringen NaCl-Konzentrationen, höhere Dosen verursachten jedoch auch hier eine Hemmung der Photosynthese. Neben anderen Methoden zur Detektion der Photosyntheseaktivität wurde auch die Messung der Chlorophyllfluoreszenz bereits erfolgreich zur Untersuchung der Folgen von Salzstreß eingesetzt (MARLER und MICKELBART 1993).

Hiermit wurde neben einem Schwermetalleffekt auch die mögliche direkte Beteiligung der Salze an den eingetretenen Schäden der Blätter von *Nicotiana tabacum* belegt.

#### **4.4.2 Sekundäre Schädigungen des Photosyntheseapparates**

Die bisher diskutierten Ergebnisse lassen zwar den Schluß zu, daß es während der Kultivierung der Tabakpflanzen mit den salz- und/oder schwermetallhaltigen Testlösungen (Kapitel 3.3.3.1 und 3.3.3.2) zu einer direkten Beeinträchtigung der Photosynthese durch die Schwermetall- und Salzionen kam. Doch Salzstreß sowie Schwermetallstreß kann auch zu einer sekundären Beeinträchtigung der Photosynthese durch die Schädigung von Pflanzen an anderer Position führen. Dies zeigt sich besonders an den Experimenten in dieser Arbeit, wurde aber auch durch andere Autoren bestätigt. Der durch die Kultivierung in den salz/schwermetallhaltigen Testlösungen verursachte Rückgang der Konzentration einiger Ionen (Ca, B, Mn, Mo) in den Blättern der Tabakpflanzen (Kapitel 3.3.2.3) bildet ebenso wie ein geringerer Chlorophyllgehalt dieser Pflanzen (Kapitel 3.3.3.3) und die Zerstörung der Wurzeln (Kapitel 3.3.3.4) ein Indiz hierfür. Die möglichen Ursachen und Folgen dieser Prozesse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

##### **4.4.2.1 Zerstörung der Wurzeln**

In Kapitel 3.3.3.4 wurde die starke Schädigung der Wurzeln durch die Testlösungen dargestellt. Dabei führte sowohl die reine Salzlösung IP21-Lösung als auch die mit Schwermetallen dotierte IP21-Lösung zu einer Beeinträchtigung der Wurzeln.

Die Ursachen für diese Wirkung von Schwermetallen sind u.a. in ihrer Bindung an die SH-Gruppen der Biomembranen und der Schädigung ihrer Permeabilitätsbarriere zu suchen (DE VOS et al. 1991). OUZOUNIDOU et al. (1992) berichteten z.B. von einer schwerwiegenden Zerstörung der Wurzelzellen von *Thlaspi ochroleucum* durch Kupfer. Es wurde auch von einer weiteren Wirkung von Kupferstreß auf Biomembranen berichtet: nach STRANGE und MACNAIR (1991) und MOUSTAKAS et al. (1992) kann Kupfer die Aktivität der Kaliumkanäle in der Biomembran der Wurzelzellen verändern. Dies kann zu einem starken Kaliumverlust der Zellen bei gleichzeitiger Kupferaufnahme führen.

Nicht nur eine Schwermetallbelastung der Wurzeln, sondern auch ein Salzstreß kann zur Zerstörungen oder Veränderungen der Membranen führen. CRAMER et al. (1995) fanden eine Hemmung der K-Shuttle-Aktivität in Tomaten durch Salzstreß. Auch DEMMIG und WINTER (1986) berichteten von einer Substitution von Kalium durch Natrium verursacht durch NaCl-Streß. LYNCH und LÄUCHLI (1984) stellten einen verstärkten Kalium-Efflux aus Wurzelzellen als Folge eines Salzstress fest.

All diese unterschiedlichen Wirkungen von Salz und Schwermetallen haben die umfassende Zerstörung der Wurzeln zur Folge. Dies führt dazu, daß bei der Ionenaufnahme durch die Wurzel keine Barrieren wie z.B. den Casparischen Streifen mehr existieren, durch die eine kontrollierte Aufnahme und Selektion der Ionen erfolgen kann. Als Folge kommt es zu einem ungehinderten Einstrom von Ionen mit dem Xylemstrom. Dies bedeutet, daß nach der Zerstörung der Wurzeln die Konzentration der Salze und der Schwermetalle in den Pflanzen und besonders den Blättern ansteigt. Die verhältnismäßig geringen Konzentrationen der Salze in den Blättern nach der vierwöchigen Kultivierung mit den Testlösungen (Kapitel 3.3.2.2) deutet darauf hin, daß zu diesem Zeitpunkt die Schädigungen an den Wurzeln nur gering waren. Dennoch wurde auch zu dieser Zeit bereits ein Rückgang der Konzentration verschiedener Elemente (Ca, Mn, Mo, B) in den Pflanzen verzeichnet (Kapitel 3.3.2.3), etwas, das bereits als ein Anzeichen der einsetzenden Beeinträchtigung der Wurzeln gewertet werden kann: Durch die Schädigung der Wurzeln wurden aktive Transportmechanismen zur Aufnahme von Elementen in die Wurzel gegen einen Konzentrationsgradienten so weit gestört, daß es zu einem Mangel dieser Elemente in der Pflanze kam.

Solange die Schädigungen an den Wurzeln noch gering waren, konnte der Mangel an Ca, Mn, Mo und B auch auf einer kompetitiven Hemmung der Aufnahme zurückzuführen sein. JENSEN und ADALSTEINSSON (1989) führten den Rückgang der Ca-Konzentration von pflanzlichem Gewebe bei Cu-Streß auf die Verdrängung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $\text{Cu}^{2+}$  bei der Aufnahme durch die Wurzel zurück. GORDON et al. (1989) stellten eine Reduktion der Calciumkonzentration in Blättern von Ahorn nach Applikation von Deponiesickerwasser fest. Auch OUZOUNIDOU (1994) stellt eine Abnahme der Calciumkonzentration in Blättern von *Silene compacta* nach Behandlung mit Kupfer fest.

Aber auch eine hohe Salzbelastung der Pflanzen kann eine Abnahme der Konzentration wichtiger Ionen im Gewebe zur Folge haben. HAMADA und EL-ENANY (1994) stellten einen Rückgang der Ca-Konzentration in Blättern von Erbsen durch Behandlung mit NaCl fest. Sie gaben jedoch keine Erklärung für dieses Verhalten. Auch CRAMER et al. (1985) und MAAS und GRIEVE (1987) stellten eine Reduzierung der Calciumkonzentration als grundlegende Folge eines Salzstresses in Form von  $\text{Na}^+$ -Überschuß fest.

Unabhängig von der Ursache für die verringerte Konzentration der genannten Elemente in den Pflanzen kann ein Mangel an diesen Elementen zu schweren Funktionsstörungen des pflanzlichen Metabolismus und somit auch der Photosynthese führen. Mo ist Bestandteil eines niedermolekularen Cofaktors der Nitratreduktase, B übt unmittelbaren Einfluß auf Membraneigenschaften aus, darüber hinaus reagiert das meristematische Wachstum sehr sensibel auf Bormangel. Mangan spielt eine wichtige Rolle in der Photosynthese, da der wasserspaltende Komplex ein Manganprotein ist. Calcium wirkt zellwand- und membranverfestigend und aktiviert Calmodulin, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, das im aktiven Zustand verschiedene Enzyme stimuliert (jeweils aus: LIBBERT 1987). Die Auswirkung eines Nährstoffmangels auf die Photosyntheseaktivität wurde darüber hinaus auch durch die Kultivierung von Tabakpflanzen in deionisiertem Wasser demonstriert. Der hierbei künstlich induzierte Nährstoffmangel führte, wie auch die Kultivierung in den Testlösungen (undotierte und dotierte IP21, dotiertes aqua dest.), zu einer Verringerung der Größe des photosynthetischen Vitalitätsindex (Fv/Fm). Die hierbei beobachteten Unterschiede zwischen der Wirkung des deionisierten Wassers und den Testlösungen sind dadurch zu erklären, daß in den Experimenten

mit den Testlösungen zum Nährstoffmangel auch immer noch die Wirkungen der Schwermetalle und/oder Salze hinzukam.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen kann gefolgert werden, daß die Zerstörung der Wurzel durch Salz- und/oder Schwermetallstreß einen Mangel bestimmter Nährstoffe verursachte und dies eine der Ursachen für die gemessene Reduktion der Fv/Fm-Werte war. Allerdings war das Ausmaß des in Kapitel 3.3.2.3 beschriebenen Mangels an einigen Elementen nur relativ gering, so daß ein Nährstoffmangel wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Schädigung der Pflanzen und der Beeinträchtigung der Photosynthese spielte.

#### **4.4.2.2 Chlorophyllgehalte der Tabakblätter**

Die Kultivierung der Tabakpflanzen mit den beiden Testlösungen führte zu einer Reduktion des Chlorophyllgehaltes der Blätter (Kapitel 3.3.3.3). Hierbei verursachte die mit Schwermetallen dotierte Salzlösung IP21 zwar bereits bei geringerer Konzentration einen derartigen Effekt, doch auch die Kultivierung der Pflanzen in reiner Salzlösung IP21 wirkte sich negativ auf den Chlorophyllgehalt aus. Da eine Verringerung des Chlorophyllgehaltes sich negativ auf die Photosyntheseleistung einer Pflanze auswirken kann, wird dieses Thema an dieser Stelle im Rahmen der sekundären Schädigungen behandelt.

Ein Vergleich der Chlorophyllgehalte der Blätter mit ihren Fv/Fm-Werten erfolgt in Kapitel 4.5 im Zusammenhang mit der allgemeinen Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Messung der Chlorophyllfluoreszenz als Phytotoxizitätstest.

Die niedrigen Chlorophyllgehalte können unterschiedliche Ursachen haben. Salz- und Schwermetallstreß wirken sich direkt auf den Chlorophyllgehalt von Pflanzen aus. Auch indirekte Auswirkungen von Streßfolgen auf den Chlorophyllgehalt sind nicht auszuschließen. Zu diesen Folgen gehören die Beeinträchtigungen der Biomembranintegrität; sowohl durch die Schwermetalle oder Salze direkt als auch durch die als Folge des oxidativen Stresses gebildeten Radikale.

Zu den direkten Folgen des Salzstreß zählt z.B. die von STROGOV et al. (1970) (cit. ex. HAMADA und EL-ENANY 1994) festgestellte Auswirkung auf die Bindungskräfte der Pigment-Protein-Lipid-Komplexe der Chloroplasten.

Auch über den Einfluß von Schwermetallen auf den Chlorophyllgehalt bzw. die Chlorophyllsynthese gibt es ebenfalls bereits einige Untersuchungen. STOBART et al.



(1985) und RASCIO et al. (1993) zeigten, daß Cadmium die Chlorophyllsynthese durch Hemmung der Aktivität der Protochlorophyllid-Reduktase beeinflusst. Ein Rückgang der Chlorophyllgehalte der Blätter durch Kupferstreß wurde auch von OUZOUNIDOU (1994) beschrieben.

#### **4.4.3 Einfluß der Testlösungen auf die Chlorophyllfluoreszenz der unterschiedlichen Blattetagen von *Nicotiana***

Unabhängig von der Art des Stresses (reiner Salzstreß, Salz- und Schwermetallstreß in Kombination oder reiner Schwermetallstreß), den die Tabakpflanzen während der 14 Wochen ausgesetzt waren, wurden die Blätter, die vor Einsetzen des Stresses bereits voll ausgebildet waren, im Gegensatz zu den danach gebildeten nicht oder nur kaum betroffen. Sie zeigten eine Entwicklung wie auch die Blätter der Kontrollpflanzen (Kapitel 3.3.3.1).

Die Analyse der Metallgehalte der Tabakblätter zeigte jedoch, daß auch in den Blättern, die vor der Applikation der Testlösungen bereits voll ausgebildet waren, hohe Schwermetall- und Salzkonzentrationen nachzuweisen waren. Dennoch schien der Schwermetall- oder Salzstreß in diesen Blättern eine geringere toxische Wirkung auf die Photosynthese auszuüben als in Blättern, die erst nach der Applikation gebildet wurden. Im Falle der Wirkungen der Schwermetalle kann der Grund hierfür in einer Komplexierung der Schwermetalle durch Phytochelatine in den Zellen liegen, wodurch die Toxizität der Schwermetalle stark vermindert wurde (RAUSER 1995). Aber auch die Folgen der hohen Salzbelastung, wie oxidativer Streß oder Zerstörungen der Membranen, konnten scheinbar von den in diesen Blättern intakten Streßabwehrmechanismen (z.B. hohe SOD-Aktivität) verringert werden. Ein Grund für die fast ausschließliche Schädigung der nach dem Einsetzen des Stresses entwickelten Blätter könnte darauf beruhen, daß in diesen Blättern die Anlage zur Ausbildung von Streßabwehrmechanismen bereits während der Blattentwicklung irreversibel stark geschädigt wurde, während nur die ohne Streßeinwirkung gebildeten Blätter diese in vollem Umfang aktivieren konnten. Allerdings reicht diese Erklärung nicht aus, um dieses so deutlich ausgeprägte Phänomen vollständig zu beschreiben. Unterschiede in der Blattmorphologie zwischen den Zellen der älteren, bereits fertig ausgebildeten Blätter und den jungen an der Sproßspitze spielten hierbei evtl. auch eine Rolle: Die Zellwände in älteren Blättern waren im Vergleich zu den jüngeren viel dicker. Dies konnte dazu führen, daß die Schwermetalle oder

andere Ionen zwar in die älteren Blätter transportiert wurden, diese sie aber in geringerem Maß in ihre Zellen aufnahmen als in den jüngeren Blättern. Diese Theorie könnte in weitergehenden Untersuchungen durch einen Vergleich der Schwermetallgehalte von protoplastierten Blattzellen mit intakten Blättern überprüft werden.

Die unterschiedliche Schädigung der verschiedenen Blattetagen könnte außerdem darin begründet sein, daß die jungen Blätter an der Sproßspitze einen Ort mit hohem Nährstoffbedarf darstellten und somit auch noch Substanzen über das Phloem in sie transportiert wurden, wohingegen die älteren Blätter an der Sproßbasis als Quelle fungierten, d.h. Stoffe über die Phloembahnen aus ihnen heraustransportiert wurden. Dies hatte zur Folge, daß z.B. Schwermetalle in die älteren Blätter nur mit dem Xylemstrom gelangen konnten, wohingegen die Schwermetalle in die jungen Blätter zusätzlich auch in organisch komplexierter Form mit dem Phloemstrom befördert werden konnten. Somit ergaben sich für die jungen Blätter nicht nur zusätzliche Transportmöglichkeiten, sondern durch die organisch-gebundene Form der Schwermetalle im Phloem auch erweiterte Aufnahmemechanismen.

Die Testlösungen hatten keinen deutlichen Einfluß auf die Frequenz der Entwicklung neuer Blätter, und ebenso wiesen die neu gebildeten jungen Blätter auch keine oder nur geringe Unterschiede der Fv/Fm-Werte verglichen mit den korrespondierenden Blättern der Kontrollpflanzen auf. Dies galt jedoch nur bis zu einem gewissen Grad der Schädigung. Die stark belasteten Pflanzen zeigten nach einiger Zeit auch einen Rückgang der Fv/Fm-Werte der jüngsten Blätter.

Die mit der Chlorophyllfluoreszenz ermittelbaren Schädigungen am Photosyntheseapparat setzten erst einige Tage nach Ausbildung der Blätter ein. Die Schwermetalle oder Salze wurden jedoch auch bereits während der Phase der frühesten Blattentwicklung in die Blätter transportiert. Offensichtlich fand die Ausprägung der Schädigung durch den Schwermetall- oder Salzstreß auf den Photosyntheseapparat nicht unmittelbar statt. Möglicherweise waren die Zellen auch anfänglich noch in der Lage, die Wirkungen der Stressoren zu kompensieren oder durch Detoxifizierungsmechanismen, die bald erschöpft waren, abzuschwächen.

Wenn die gesamte Pflanze jedoch bereits so gravierend geschädigt war, wie es nach der vierzehnten Woche der Kultivierung mit den Testlösungen der Fall war, dann

konnte keine normale Blattentwicklung mehr stattfinden und auch die jüngsten Blätter zeigten deutliche Streßsymptome.

#### **4.5 Beurteilung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz an *Nicotiana* als neuer Phytotoxizitätstest**

Die Ergebnisse der Kultivierung der Tabakpflanzen mit den drei unterschiedlichen Testlösungen und die Diskussion über die möglichen Ursachen der Wirkung auf die Pflanzen und speziell den Photosyntheseapparat zeigen, wie komplex die Wirkungen der eingesetzten Lösungen auf Pflanzen sein können. Aus diesem Grund können auch mit den eingesetzten Standardtests nicht sämtliche Effekte der Testlösungen erfaßt werden: Mit den beiden Methoden mit *Chlamydomonas* können z.B. keine Beeinträchtigungen des Langstreckentransportes detektiert werden. Dennoch bewährten sich die Tests sowohl für die Bewertung von salinen wie auch nicht-salinen Abfalleluaten. In nahezu allen Fällen führten die Ergebnisse des *Chlamydomonas*-Photosynthese- und des *Chlamydomonas*-FDA-Tests zu einer gleichen Bewertung der Toxizität der Eluate. Aus diesem Grund ist es nicht sinnvoll, beide Verfahren parallel auszuführen, sondern sinnvoller, eine Methode auszuwählen und diese mit einem weiteren Test an einem anderen Organismus zu überprüfen.

Die Tests mit *Lemna* und *Lepidium* erlauben zwar keine direkte Erfassung der Photosyntheseleistung, allerdings ermöglichen sie indirekte Aussagen zur Schädigung der Photosynthese, da sich eine Hemmung der Photosynthese auch negativ auf das Wachstum dieser beiden Pflanzen auswirkt.

*Lemna* und *Lepidium* sind aufgrund ihrer hohen Salzempfindlichkeit zwar nicht zur Bewertung von salzhaltigen Lösungen geeignet, dennoch stellen die Tests mit *Lemna* und *Lepidium* geeignete Verfahren zur Bestimmung der Toxizität von salzarmen Testlösungen dar. Die Anwendung des *Lepidium*-Tests kann jedoch leicht zu Fehlinterpretationen der Wirkung von Testlösungen führen, da sich Überlagerungen von Wachstumshemmung und -steigerung ergeben können. Dies hat zur Folge, daß dieser Test grundsätzlich nur als Zusatz zu weiteren Verfahren angewendet werden sollte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Tabakpflanzen zeigen, daß Schädigungen an den Pflanzen ungeachtet ihrem Wirkmechanismus sich immer

auch sekundär auf die Photosyntheseleistung auswirkten, wenn nicht bereits ein primärer Effekt auf den Photosyntheseapparat ausgeübt wurde. Aus diesem Grund stellt die Messung der Chlorophyllfluoreszenz nicht nur im Rahmen von pflanzenphysiologischen Untersuchungen, sondern auch als Ökotoxizitätstests ein gut geeignetes Mittel dar, um vielfältige Beeinträchtigungen des pflanzlichen Metabolismus zu detektieren.

Hierbei weist die Messung der Chlorophyllfluoreszenz an Tabakpflanzen im Gegensatz zum sonst sehr sensiblen *Lemna*-Blattwachstumstest den Vorteil der hohen Salzresistenz auf, was den erstgenannten Test ganz besonders zur Bewertung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten prädestiniert.

Ein weiterer Vorteil der Messung der Chlorophyllfluoreszenz bietet sich darin, daß sie nicht destruktiv ist, so daß im Rahmen von Langzeituntersuchungen auch Messungen an identischen Blättern über einen langen Zeitraum vorgenommen werden können.

In Kapitel 3.3.3.1 wurde gezeigt, daß die Fv/Fm-Werte der einzelnen Blattetagen einer Pflanze sehr variierten. Dies machte es zur genauen Bestimmung der Wirkung einer Testlösung notwendig, die Chlorophyllfluoreszenz mehrerer Blattetagen aufzunehmen. Hierdurch wurde der Test sehr zeitaufwendig. Aus diesem Grund kann bei der Bewertung von nicht salinen Testlösungen auf ihn zu Gunsten von Tests mit *Chlamydomonas*, *Lemna* und *Lepidium* verzichtet werden. Im Falle von salinen Lösungen ist er jedoch neben den Methoden mit *Chlamydomonas* unverzichtbar.

Doch auch der Fluoreszenztest hat wie jeder andere Ökotoxizitätstest seine Grenzen. Dies zeigt sich bei einem Vergleich der Fv/Fm-Werte mit den ermittelten Chlorophyllkonzentrationen der Blätter. Einige Blätter der Pflanzen, die z.B. in 5 mL/L der undotierten IP21-Lösung kultiviert worden waren, wiesen sehr geringe Chlorophyllkonzentrationen auf. Dies war ein Zeichen für die schädigende Wirkung der Testlösung. Trotz der niedrigen Chlorophyllkonzentrationen wurden an diesen Blättern hohe Fv/Fm-Werte gemessen. Die alleinige Berücksichtigung der Chlorophyllfluoreszenz hätte die Beeinträchtigung der Pflanzen durch die Testlösung nicht erfaßt.

Die Daten des Fluoreszenztests müssen daher, wie die Ergebnisse anderer Phytotoxizitätstests, durch die Durchführung weiterer Tests basierend auf unterschiedlichen Wirkungsmechanismen und Testorganismen abgesichert werden.

## 5 Zusammenfassung

Eine große Zahl von Abfällen sind gemäß TA Abfall für die untertägige Ablagerung in Salzstöcken vorgesehen, um sie so vom hydrologischen Kreislauf fernzuhalten. Dennoch kann ein hydraulischer Kontakt zu grundwasserführenden Schichten aufgrund geologischer Prozesse nicht ausgeschlossen werden. Zur Bewertung des Umweltverhaltens schwermetallhaltiger Abfalleluate muß die toxische Wirkung auf biotische Ausschnitte von Ökosystemen und deren Funktionen erfaßt werden.

In dieser Arbeit wurde die Eignung von vorhandenen Testsystemen zur Bewertung der toxischen Wirkungen von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten untersucht. Dabei war es das Ziel, die Leistungsfähigkeiten und Grenzen der Phytotoxizitätstests zu prüfen und darzustellen. Es wurde analysiert, worauf die Ursachen möglicher Fehlinterpretationen basieren.

Hierzu war es nötig mit Analysen der Chlorophyllfluoreszenz an Tabakpflanzen ein neues Testsystem zur Bewertung von salinen Abfalleluaten zu etablieren.

Folgende Phytotoxizitätstests wurden eingesetzt: *Chlamydomonas*-Photosynthesetest, FDA-Test mit *Chlamydomonas*, Blattwachstumstest mit *Lemna minor*, Wurzellängentest mit *Lepidium sativum*, Wachstumshemmtest mit verschiedenen Landpflanzen und Wachstumshemmtest mit einer Zellkultur von *Nicotiana tabacum*.

Der Vergleich des hemmenden Einflusses der bei der Flutung der Salzstöcke entstehenden Salzlaugen mit der Toxizität der salinen Abfalleluate zeigte, daß nur die Tests mit *Chlamydomonas* die Schädigung der Schwermetalle erfaßten. Im Falle der übrigen Testmethoden wurden die Schwermetallwirkungen von einer sehr hohen Salzempfindlichkeit der Organismen überlagert.

Zur Bewertung von nicht-salinen Abfalleluaten waren hingegen alle Tests geeignet, unterschieden sich allerdings in ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Schadstofflösungen. Dabei zeigte der Blattwachstumstest mit *Lemna minor* die größte Sensitivität, wohingegen das Wurzellängenwachstum von *Lepidium sativum* am geringsten beeinflußt wurde. Sowohl der *Chlamydomonas*-FDA-Test als auch der *Chlamydomonas*-Photosynthesetest wiesen eine mittlere bis hohe Empfindlichkeit auf.

Die Ursachen für die Verschiedenartigkeit der Testergebnisse abhängig vom eingesetzten Organismus basierten auf den differierenden Wirkmechanismen der untersuchten Schadstoffe. Nicht mit jedem Organismus konnten sämtliche Einflüsse der Testlösungen erfaßt werden. Beeinträchtigungen der Wurzelfunktion konnten

z.B. mit *Chlamydomonas* nicht detektiert werden. Um die Gründe für die Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen zu ermitteln, wurden an Tabakpflanzen, als ein Modellsystem für höhere Pflanzen, die potentiellen Wirkmechanismen der Testlösungen analysiert. Als eine beispielhafte Testlösung wurde eine reine Salzlösung und eine mit Schwermetallen versetzte Salzlösung bzw. mit Schwermetallen versetztes destilliertes Wasser verwendet.

Die Elementanalysen der einzelnen Organe zeigten, daß sowohl die meisten Schwermetalle (Cu, Ni, Zn und Cd) als auch viele Ionen, die in der reinen Salzlösung in hohen Konzentrationen enthalten waren, in die Pflanzen aufgenommen und bis in die Blätter hinein verlagert wurden. Damit einhergehend wurde eine Abnahme der Konzentrationen einiger wichtiger Mikroelemente in den Tabakpflanzen festgestellt.

Durch die Aufnahme verschiedener Parameter der Chlorophyllfluoreszenz wurde ein schädigender Einfluß der Schwermetallbelastungen auf den Photosyntheseapparat nachgewiesen. Neben den Schwermetallen führten auch die hohen Konzentrationen von Salzen in den Testlösungen zu einer Veränderung der Fluoreszenzdaten, die im Vergleich zum Schwermetalleffekt wesentlich geringer ausfiel. Diese Wirkungen der Schwermetalle und Salze wurden ebenfalls durch Bestimmungen der Chlorophyllgehalte der Blätter detektiert. Diese Methode ist jedoch destruktiv und eignet sich nicht zur Bewertung von Pflanzenschädigungen über einen langen Zeitraum.

Die ermittelten Elementgehalte der Blätter in Verbindung mit den Fluoreszenzdaten führten zu dem Schluß, daß es zu einer direkten Schädigung des Photosyntheseapparates durch die Testlösungen kam. Ferner wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Wurzeln die massive Zerstörung der Wurzeln als Folge der Kultivierung mit den Testlösungen dargestellt.

Unabhängig vom Wirkmechanismus konnten die Schädigungen über die Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz eindeutig nachgewiesen werden. Damit ist diese Methode für viele verschiedene Testlösungen, auch besonders für saline Eluate, sehr geeignet.

Aber auch der Messung der Chlorophyllfluoreszenz sind als Testmethode Grenzen gesetzt, da in einem Fall der Vergleich mit den Chlorophyllgehalten erst die wahre Toxizität einer Testlösung zeigte.

Als Schlußfolgerung ergab sich, daß zur Bewertung potentiell toxischer Lösungen immer mehrere Ökotoxizitätstests basierend auf unterschiedlichen Wirkmechanismen und unterschiedlichen Organismen einzusetzen sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alga, Growth Inhibition Test; OECD Guideline for Testing of Chemicals 201, adopted 07.06.1984
- Allan, D.L., Jarell, W.M. (1989): Proton and Copper adsorption to maize and soybean root cell walls. *Plant Physiology* 89: 823-832
- Arambasic, M.B., Bjelic, S., Subakov, G. (1995): Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: Comparative investigations and the practical applications. *Water Research* 29(2): 497-503
- Arnon, D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts, Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* 24: 1-15
- Aylett, B.J. (1979): The chemistry and bioinorganic chemistry of cadmium. In: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (ed. M. Webb). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford: 1-43
- Bansal, R.L., Chahal, D.S. (1990): Interaction effect of iron and manganese on growth and nutrient content of moong (*Phaseolus aureus* L.). *Acta Agronomica Hungarica* 39(1-2): 59-64
- Bentley-Mowat, J.A. (1982): Application of Fluorescence Microscopy to Pollution Studies on Marine Phytoplankton. *Botanica Marina* 25: 203-204
- Bethke, P.C., Drew, M.C. (1992): Stomatal and Nonstomatal Components to Inhibition of Photosynthesis in Leaves of *Capsicum annuum* during Progressive Exposure to NaCl Salinity. *Plant Physiology* 99: 219-226
- Björkman, O., Demmig, B. (1987): Photon yield of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta (Heidelberg)* 170(4): 489-504
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., Öquist, G. (1993): Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Chapman and Hall, London: 193-206
- Calabrese, E.J. (1998): Hormesis as a Biological Hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 106: 357-362
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. (1993): Possible Examples of chemical hormesis in a previously published Study. *Journal of Applied Toxicology* 13: 169-172
- Chapman, D.F., Robson, M.J., Snaydon, R.W. (1992): Interactions between defoliation and the nitrogen nutrition of white clover (*Trifolium repens* L.): Effects on carbon utilization in clonal plants. *Plant And Soil* 139(2): 157-166
- Clement, B. Janssen, C., Le Du Delepierre, A. (1997): Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 2. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests. *Chemosphere* 35(11): 2783-2796

- Clement, B., Persoone, G., Janssen, C., Le Du Delepierre, A. (1996): Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates: I. Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. *Chemosphere* 33(11): 2303-2320
- Cowgill, U.M., Milazzo, D.P., Landenberger, B.D. (1991): The sensitivity of *Lemna gibba* G-3 and four clones of *Lemna minor* to eight common chemicals using a 7-day test. *Research Journal Of The Water Pollution Control Federation* 63(7): 991-998
- Cramer, G.R., Lauchli, A., Polito, V.S. (1985): Displacement of calcium by sodium from the plasmalemma of root cells: A primary response to salt stress? *Plant Physiology (Bethesda)* 79(1): 207-211
- Cramer, M.D., Schierholt, A., Wang, Y.Z., Lips, S.H. (1995): The influence of salinity on the utilization of root anaplerotic carbon and nitrogen metabolism in tomato seedlings. *Journal of Experimental Botany* 46(291): 1569-1577
- De Vos, C.H.R., Schat, H., De Wall, M.A.M., Vooijs, R., Ernst, W.H.O. (1991): Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cubalus*. *Physiol. Plantarum* 82: 523-528
- Demmig, B., Winter, K. (1986): Sodium, potassium, chloride and proline concentrations of chloroplasts isolated from a halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* 168: 421-426
- Den Dooren De Jong, L.E. (1965), Tolerance of *Chlorella vulgaris* for metallic and non-metallic ions. *Antonie van Leeuwenhoek* 31: 301-313
- Devare, M., Bahadir, M. (1994): Biological monitoring of landfill leachate using plants and luminescent bacteria. *Chemosphere* 28(2): 261-271
- Dorsey, J., Yentsch, C.M, Mayo, S., McKenna, C. (1989): Rapid Analytical Technique for the Assessment of Cell Metabolic Activity in Marine Microalgae. *Cytometry* 10: 622-628
- Downton, W.J.S. (1977): Photosynthesis in salt-stressed grapevines. *Australian Journal of Plant Physiol.* 4: 183-192
- Eagle, H. (1971), Buffer Combinations for Mammalian Cell Culture. *Science* 174: 500-503
- Ennis, C.A., Lazrus, A.L., Zimmerman, P.R. (1990): Flux determinations and physiological response in the exposure of red spruce to gaseous hydrogen peroxide, ozone, and sulfur dioxide. *Tellus Series B Chemical And Physical Meteorology* 42(2): 183-199
- Epstein, E. (1965) In: Bonner, J, Varner, J.E. (eds) *Plant Biochemistry*. Academic Press, New York, London. 438-466
- Fedina, I.S., Tsonev, T.D., Guleva, E.I. (1994): ABA as a modulator of the response of *Pisum sativum* to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 143(2): 245-249



- Florijn, P.J., Nelemans, J.A., van Beusichem, M.L. (1992): The influence of the form of nitrogen nutrition on uptake and distribution of cadmium in lettuce varieties. *Journal of Plant Nutrition* 15(11): 2405-2416
- Francis, P.C., Petersen, R.L. (1989): Assessment of toxicity of heavy metal ion combinations on spore germination and protonemal growth of *Polytrichum commune*. *Bryologist* 92(1): 60-67
- Frey, B.E., et al. (1983): Sensitivity of estuarine phytoplankton to hexavalent chromium. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 17: 181-187
- Führer, J. (1982): Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 70: 162-167
- Gabbrielli, R., Pandolfini, T. (1984): Effect of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  on the response to nickel toxicity in a serpentine endemic and nickel-accumulating species. *Physiologia Plantarum* 62(4): 540-544
- Gilbert, F., Galgani, F., Cadiou, Y. (1992): Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. *Marine Biology* 112: 199-205
- Godbold, D.L. (1991): Mercury-induced root damage in spruce seedlings. *Water Air And Soil Pollution* 56(0): 823-832
- Good, N.E., Izawa, S. (1972): Hydrogen Ion Buffers. *Methods in Enzymology* 24: 53-68
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M. (1966): Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry* 5: 467-477
- Gordon, A.M., McBride, R.A., Fisk, A.J., Bates, T.E. (1989): Effect of landfill leachate irrigation on red maple (*Acer rubrum* L.) and sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) seedling growth and on foliar nutrient concentrations. *Environmental Pollution* 56(4): 327-336
- Grossmann, K., Berghaus, R., Retzlaff, G. (1992): Heterotrophic plant cell suspension cultures for monitoring biological activity in agrochemical research: Comparison with screens using algae, germinating seeds and whole plants. *Pesticide Science* 35(3): 283-289
- Hamada, A.M., El-Enany, A.E. (1994): Effect of NaCl on growth, pigment and mineral element contents, and gas exchange of broad bean and pea plants. *Biologia Plantarum* 36(1): 75-81
- Harms, H.H. (1992): In vitro Systems for Studying Phytotoxicity and Metabolic Fate of Pesticides and Xenobiotics in Plants. *Pestic. Sci.* 35: 277-281
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950): The water-culture method for growing plants without soil. *Circular 347*, Calif Agr Exp Station, Berkeley
- Hutchinson, T.C., Stokes, P.M. (1975): Heavy metal toxicity and algal bioassays. *Amer. Soc. for Testing and Materials. Special Tech. Publ.* 573: 321-343

- Jensen, P., Adalsteinsson, S. (1989): Effects of copper on active and passive  $\text{Rb}^+$  influx in roots of winter wheat. *Physiologia Plantarum* 75: 195-200
- Källqvist, T., Carlberg, G.E., Kringstad, A. (1989): Ecotoxicological characterization of industrial wastewater: Sulfite pulp mill with bleaching. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 18(3): 321-336
- Körner, L.E., Møller, I.M., Jensén, P. (1987): Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and other divalent cations on uptake of  $\text{Ni}^{2+}$  by exised barley roots. *Physiol. Plantarum* 71: 49-54
- Krause, G.H. und Weis, E. (1991): Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Ann. Rev. Plnt Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349
- Krupa, Z., Öquist, G., Huner, N.P.A. (1992): The influence of cadmium on primary photosystem II photochemistry in bean as revealed by chlorophyll a fluorescence: A preliminary study. *Acta Physiologiae Plantarum* 14(2): 71-76
- Lambolez, L., Vasseur, P., Ferard, J.F., Gisbert, T. (1994): The environmental risks of industrial waste disposal: An experimental approach including acute and chronic toxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28(3): 317-328
- Larcher, W., Wagner, J., Thammathaworn, A. (1990): Effects of superimposed temperature stress on in vivo chlorophyll fluorescence to *Vigna unguiculata* under saline stress. *Journal Of Plant Physiology* 136(1): 92-102
- Lee, C.-H., Chang, H., Ha, S.-B., Lee, C.B. (1995): Mercury-Induced Light-Dependent Alterations of Chlorophyll a Fluorescence Kinetics in Barley Leaves. *Journal of Plant Biology* 38/1: 11-18
- Lee, E.H. (1991): Chlorophyll fluorescence as an indicator to detect differential tolerance of snapbean cultivars in response to ozone stress. *Taiwania* 36(3): 220-234
- Leidi, E.O., Gutierrez, J.C. (1994): Note about variability in root growth of cotton at seedling stage: Effect of genotype and osmotic stress. *Investigacion Agraria Production y Protection Vegetales* 8: 165-169
- Leigh, R.A., Wyn Jones, R.G. (1984): A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* 97: 1-13
- Li, E.H., Miles, C.D. (1975): Effects of cadmium on photoreaction II of chloroplasts. *Plant Science Letters* 5: 33-40
- Libbert, E (1987): *Lehrbuch der Phflanzenphysiologie*. 4. Erw., neugestalt. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verl. 1987
- Lichtenthaler H.K. (1988): *In vivo* chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In: Lichtenthaler, H.K. (ed.): *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London: 129-142

- Lichtenthaler H.K., Rinderle, U. (1988): The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. - CRC crit. Rev. Anal. Chem. 19 (Suppl. 1): 29-85
- Lynch, J., Läuchli, A. (1984): Potassium transport in salt-stressed barley roots. *Planta* 161: 295-301
- Maas, E.V., Grieve, C.M. (1987): Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant Cell And Environment* 10(7): 559-564
- Marler, T.E., Mickelbart, M.V. (1993): Growth and chlorophyll fluorescence of *Spondias purpurea* L. as influenced by salinity. *Trop. Agric. (Trinidad)* 70(3): 245-247
- Meyer, M.J., Smith, M.A.L., Knight, S.L. (1989): Salinity effects on St. Augustinegrass: A novel system to quantify stress response. *Journal of Plant Nutrition* 12: 893-908
- Mishra, S.K., Subrahmanyam, D., Singhal, G.S. (1991): Interrelationship between salt and light stress on primary processes of photosynthesis. *Journal Of Plant Physiology* 138(1): 92-96
- Mohr, H, Schopfer, P. (1992): *Pflanzenphysiologie*. 4. Auflage. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York
- Monahan, T.J. (1976): Lead Inhibition of Chlorophycean Microalgae: *J. Phycol.* 12: 358-362
- Moustakas, M., Yupsanis, T., Symeonidis, L., Karataglis, S. (1992): Aluminum toxicity effects on durum wheat cultivars. *Journal Of Plant Nutrition* 15(5): 627-638
- Mozafar, A., Oertli, J.J. (1990): Multiple stress and growth of barley: Effect of salinity and temperature shock. *Plant And Soil* 128(2): 153-160
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-496
- Ouzounidou, G, Eleftheriou, E.P., Karataglis, S. (1992): Ecophysiological and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae). *Can. J. Bot.* 70: 947-957
- Ouzounidou, G. (1993): Changes in variable chlorophyll fluorescence as a result of Cu-treatment: Dose-response relations in *Silene* and *Thlaspi*. *Photosynthetica Prague* 29(3): 455-462
- Ouzounidou, G. (1994): Root growth and pigment composition in relationship to element uptake in *Silene compacta* plants treated with copper. *Journal of Plant Nutrition* 17(6): 933-943

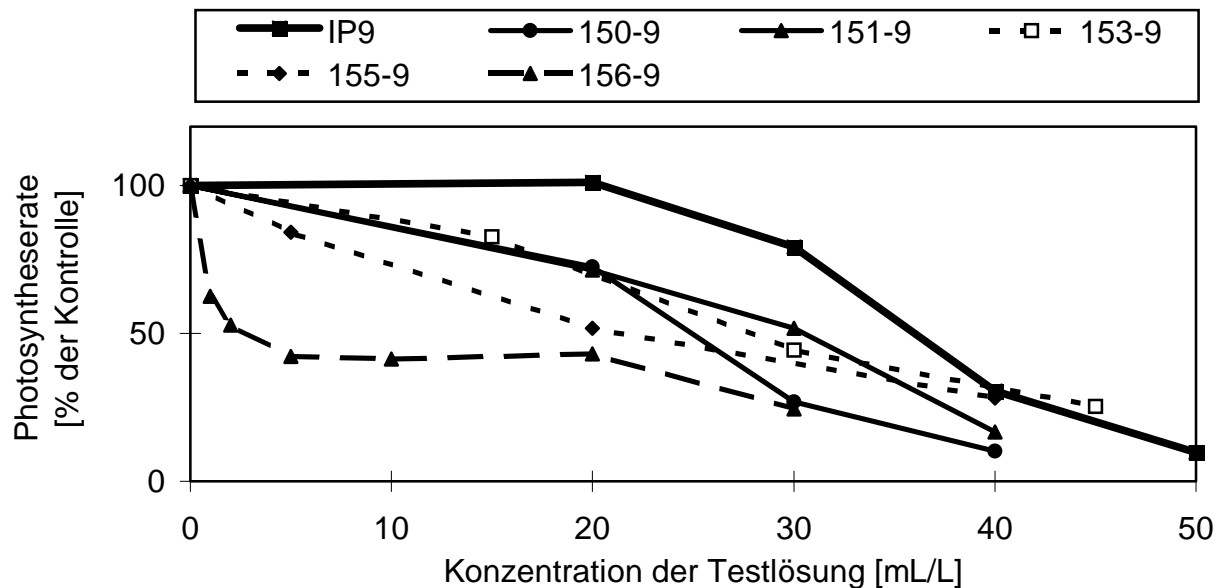
- Pellegrini, M., Laugier, A., Sergent, M., Phan-Tan-Luu, R., Valls, O., Pellegrini, L. (1993): Interactions between the toxicity of the heavy metals cadmium, copper, zinc in combinations and the detoxifying role of calcium in the brown alga *Cystoseira barbata*. *Journal of Applied Phycology* 5(3): 351-361
- Peterson, H.-G., Boutin, C., Martin, P.A., Freemark, K.E., Ruecker, N.J., Moody, M.J. (1994): Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at Expected Environmental Concentrations. *Aquatic Toxicology Amsterdam* 28(3-4): 275-292
- Prasad, M.N.V. (1995): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* 35(4): 525-545
- Qiao, L., Ho, G. (1996): The effect of clay amendment on speciation of heavy metals in sewage sludge. *Water Science and Technology* 34(7-8): 413-420
- Rascio, N., Dalla-Vecchia, F., Ferretti, M., Merlo, L., Ghisi, R. (1993): Some effects of cadmium on maize plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25(2): 244-249
- Rausser, W.E. (1995): Phytochelatins and Related Peptides. Structure, Biosynthesis, and Function. *Plant Physiol.* 109: 1141-1149
- Reichelt, C., Brasser, T., Bahadir, M., Fischer, R., Lorenz, W., Petersen, C. (1995): Auswahl und Untersuchung UTD-relevanter Abfallarten, GSF-Bericht 31/95, Neuherberg
- Riedel, G.F. (1984): Influence of salinity and sulfate on the toxicity of chromium(VI) to the estuarine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal Of Phycology* 20(4): 496-500
- Reinbott, T.M., Blevins, D.G. (1991): Phosphate interaction with uptake and leaf concentration of magnesium, calcium, and potassium in winter wheat seedlings. *Agronomy Journal* 83(6): 1043-1046
- Renger, G., Schreiber, U. (1986): Practical Applications of Fluorometric Methods to Algae and Higher Plant Research. In: *Light Emission by Plant and Bacteria*, Academic Press, New York, 1986, 587-619
- Ruth, B. (1990): The fluorescence induction kinetics as a non-destructive tool for investigating spruce treated with ozone. *Radiation And Environmental Biophysics* 29(1): 57-74
- Saarinen, T. (1993): Chlorophyll fluorescence, and nitrogen and pigment content of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles in polluted urban habitats. *Ann. Bot. Fennici* 30: 1-7
- Salim, R., Al-Subu, M.M., Atallah, A. (1993): Effects of root and foliar treatments with lead, cadmium, and copper on the uptake distribution and growth of radish plants. *Environment International* 19: 393-404
- Sallenave, R., Fomin, A. (1997): Some advantages of the duckweed test to assess the toxicity of environmental samples. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 25(3): 135-140

- Schmidt, W., Neubauer, C., Kolbowski, J., Schreiber, U., Urbach, W. (1990): Comparison of effects of air pollutants (sulfur dioxide, ozone, nitrogen dioxide) on intact leaves by measurements of chlorophyll fluorescence and P-700 absorbance changes. *Photosynthesis Research* 25(3): 241-248
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. (1994): Chlorophyll Fluorescence as a Non-intrusive Indicator for Rapid Assessment of in vivo Photosynthesis. *Ecological Studies* 100: 49-100
- Seeman, J.D., Critchley, C. (1985): Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164:151-162
- Sgardelis, S., Cook, C.M., Pantis, J.D., Lanaras, T. (1994): Comparison of chlorophyll fluorescence and some heavy metal concentrations in *Sonchus* spp. and *Taraxacum* spp. along an urban pollution gradient. *The Science of the Total Environment* 158: 157-164
- Sheoran, I.S., Singal, H.R., Singh, R. (1990): Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynth. Res.* 23: 345-351
- Shirazi M.A., Robideaux M.L., Kapustka, L.A., Wagner, J.J., Reporter, M.C. (1994): Cell Growth in Plant Cultures: An Interpretation of the Influence of Initial Weight in Cadmium and Copper Toxicity Tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 331-337
- Sieghardt, H. (1987): Heavy metal content and nutrient content of plants and soil samples from metalliferous waste dumps in Bleiberg (Carinthia, Austria): I. Herbaceous plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 150(3): 129-134
- Sillén, L.G., Martell, A.E. (1964): Stability Constants of Metal-Ion Complexes. Special Publication No. 17, The Chemical Society, London
- Starodub, M.E., Wong, P.T.S., Mayfield, C.I. (1987): Short term and long term studies on individual and combined toxicities of copper, zinc and lead to *Scenedesmus quadricauda*. *The Science of the Total Environment* 63(0): 101-110
- Stebbing, A.R.D. (1982): Hormesis - The Stimulation of Growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment* 22: 213-234
- Steinberg, C. et al. (1993): Ökotoxikologie: Bestandsaufnahmen und Perspektiven für ein ökosystemares Bewertungskonzept. GSF-Bericht 40/93, 155 S., Oberschleißheim
- Stiborova, M., Doubravova, M., Brezninova, A. (1986): Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley *Hordeum vulgare* L. *Photosynthetica* 20: 418-425

- Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R.P. (1985): The effect of cadmium ion on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley (*Hordeum vulgare* cultivar Proctor). *Physiologia Plantarum* 63(3): 293-298
- Strange, J., Macnair, M. (1991): Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance of *Mimulus guttatus* Fischer ex DC. *New Phytologist* 119(3): 383-388
- Strasburger (1983): *Lehrbuch der Botanik*. 32. Auflage. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, New York
- Strogonov, B.P., Kabanov, V.V., Shevajakova, N.I., Lapinc, L.P., Komizerko, E.I., Popov, B.A., Dostonova, R.K., Prykhod'ko, L.S. (1970): *Structure and Function of Plant Cell in Saline Habitats*. Nauka, Moskau
- Sueoka, N., Chiang, K.S., Kates, J.R. (1967): Deoxyribonucleic Acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol.* 25: 47-66
- TA ABFALL (1991); Der Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit: Gesamtfassung der zweiten allgemeinen Verwaltungsvorschrift zum Abfallgesetz (TA Abfall) vom 12.03.1991, Teil 1, GMBI 42 (8): 137 – 214, C. Heymanns Verlag, Bonn
- Taraldsen, J.E., Norberg-King, T.J. (1990): New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Toxicology And Chemistry* 9(6): 761-768
- Taylor, G.J. (1989): Multiple metal stress in *Triticum aestivum*: Differentiation between additive, multiplicative, antagonistic, and synergistic effects. *Canadian Journal Of Botany* 67(8): 2272-2276
- Thomas, J.M., Skalske, J.R., Cline, J.F., McShane, M.C., Simpson, J.C., Miller, W.E., Peterson, S.A., Callahan, C.A., Greene, J.C. (1986): Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extend using bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 5: 487-501
- Van Asche, F., Clijsters, H. (1986): Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treadment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Plant Physiology* 125: 355-360
- Van Collie, R., Couture, P., Visser, S.A. (1983): Use of Algae in Aquatic Ecotoxicology. In: *Aquatic Toxicology*. Jerome O. Nriagu (Ed.), John Wiley & Sons, New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore: 487-502
- Versluijs, C. W., Aalbers, TH. G., Van Gestel, C. A. M., Anthonissen, I. H., Adem, D. M., M., Assink, J. W. (1988): Vergleich des Auslaugverhaltens und der biologischen Verfügbarkeit von Schwermetallen in kontaminierten Böden und in Böden, die nach verschiedenen Extraktionsverfahren und thermischen Verfahren gereinigt worden sind. In: *Altlastensanierung '88*, 2. int. TNO/BMFT-Kongress über Altlastensanierung, 11. – 15.4.1988, Hamburg, Kluver Verlag, Dordrecht, Niederlande.

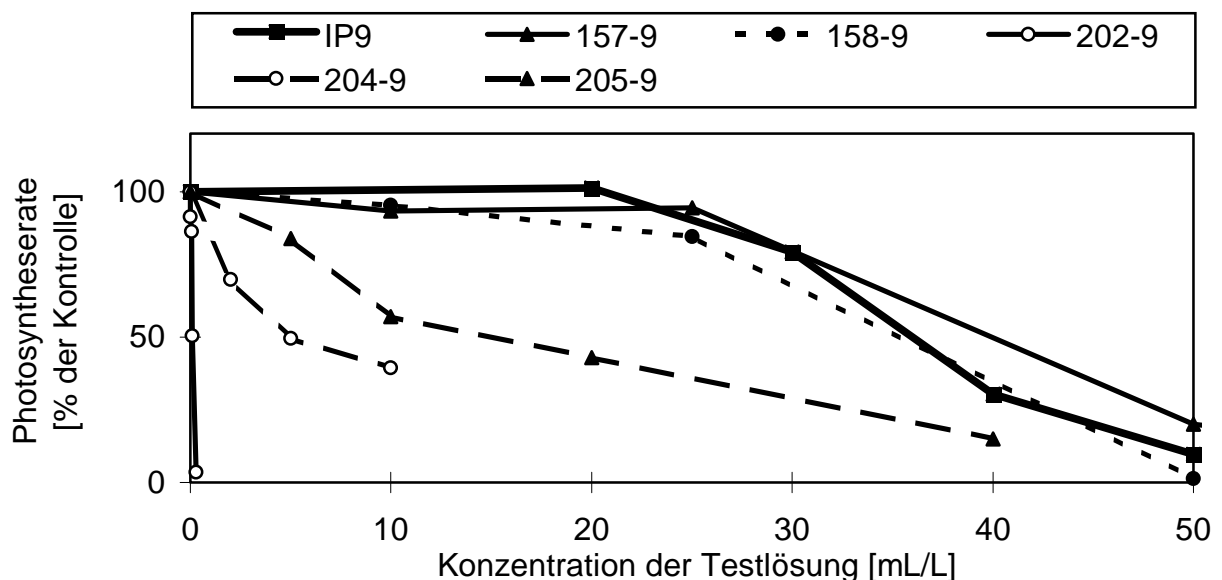
- Wagner G.J., Sutton, T.G., Yeagan, R. (1988): Root control of cadmium accumulation in tobacco. *Tobacco Science* 32: 88-91
- Wang, W., Williams, J.M. (1990): The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage and millet) for determining effluent toxicity. *Environmental Monitoring And Assessment* 14(1): 45-58
- Weigel, H.J. (1985): The effect of  $Cd^{2+}$  on photosynthetic reactins of mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.* 63: 192-200
- Welch, R.M., Wendell, A.N., Schaefer, S.C., Shaff, J.E., Kochian, L.V. (1993): Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* 190: 555-561
- Wong, S.L., Beaver, J.L. (1980): Algal bioassays to determine toxicity of metal mixtures. *Hydrobiologica* 74: 199-208
- Wuncheng, W. (1991): Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution* 59: 381-400
- Wundram, M. (1995): Die Beeinflussung der Photosynthese durch toxische Substanzen als Basis für einen Phytotoxizitätstest. Diplomarbeit TU Braunschweig, unveröffentlicht
- Wundram, M., Selmar, D., Bahadir, M. (1996): The *Chlamydomonas* test: A new phytotoxicity test based on the inhibition of algal photosynthesis enables the assessment of hazardous leachates from waste disposals in salt mines. *Chemosphere* 32: 1623-1631
- Yeo, A.R., Caporn, S.J.M., Flowers, T.J. (1985): The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *Journ. Exp. Bot.* 36: 1240-1248
- Yruela, I., Alfonso, M., de Zarate, I.O., Montoya, G., Picorel, R (1993): Precise Location of the Cu(II)-inhibitory Binding Site in Higher Plant and Bacterial Photosynthetic Reaction Centers as Probed by Light-induced Absorption Changes. *The Journal of Biological Chemistry* 268(3): 1684-1689
- Yruela, I., Montoya, G., Picorel, R. (1992): The inhibitory mechanism of Cu(II) on the Photosystem II electron transport from higher plants. *Photosynthesis Research* 33: 227-233

## 7 Anhang



**Abbildung A1: Der *Chlamydomonas*-Test: Beeinträchtigungen der Photosynthese durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP9.**

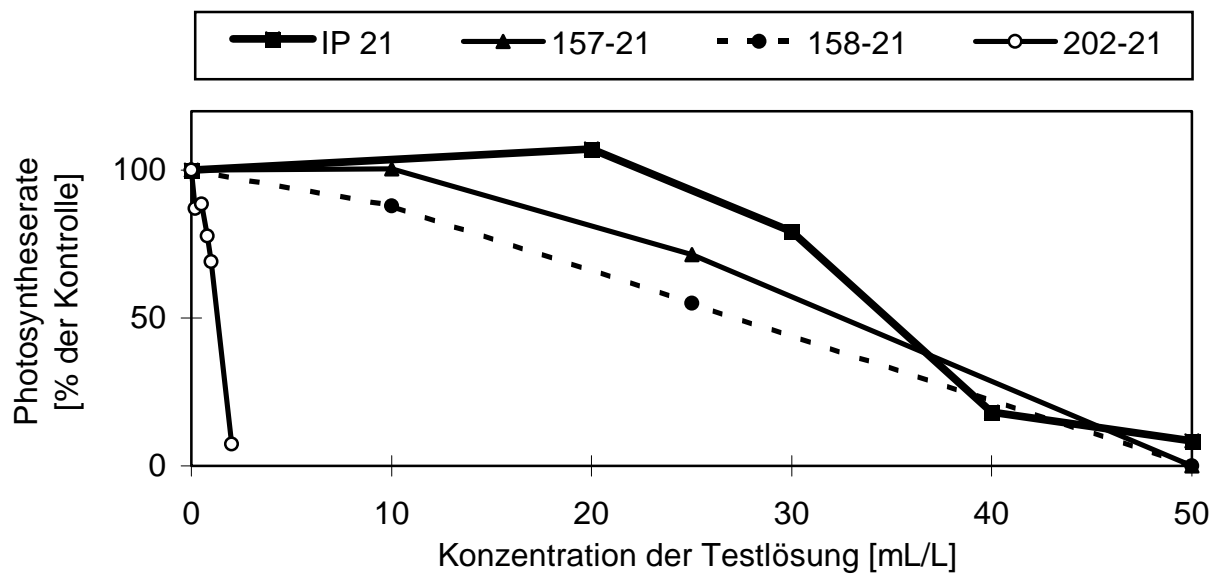
Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



**Abbildung A2: Hemmung der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP9.**

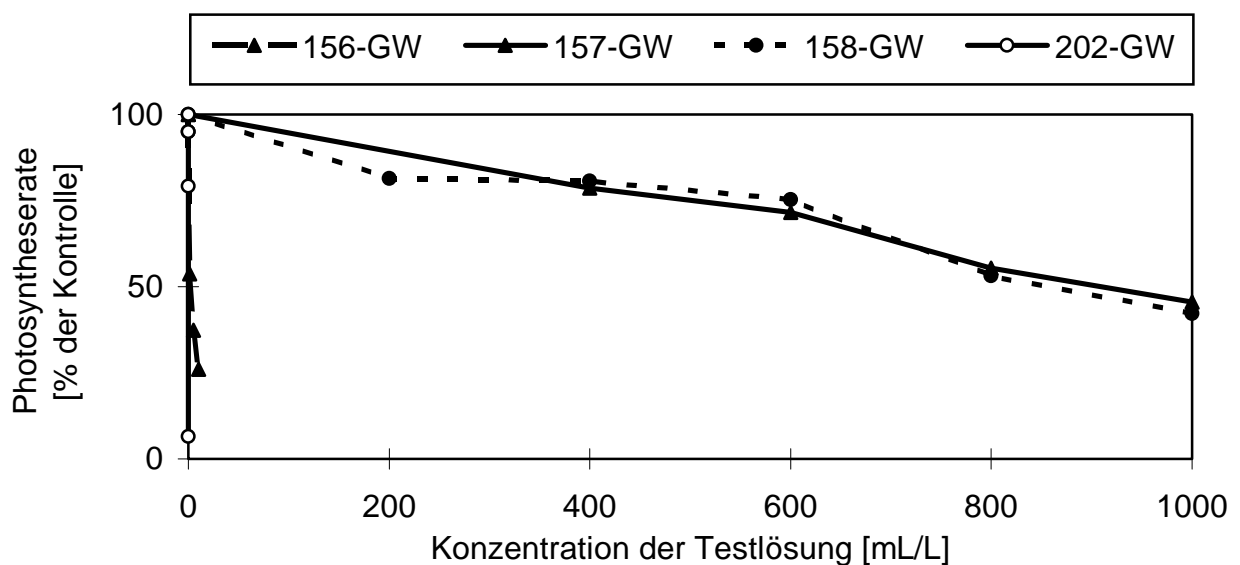
Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.





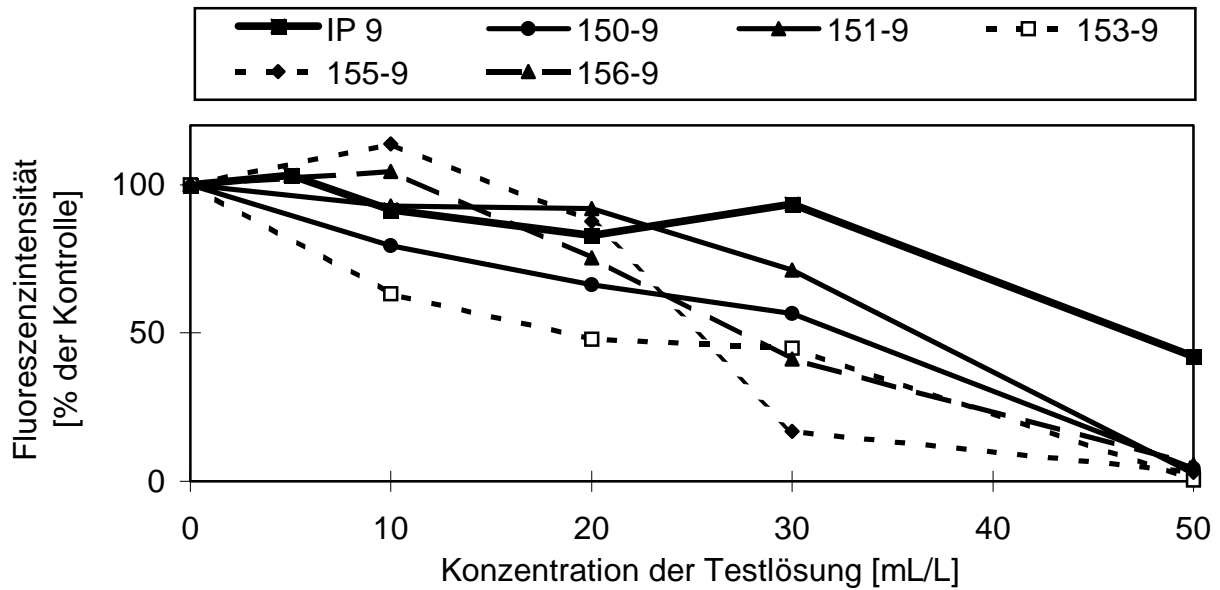
**Abbildung A3: Der *Chlamydomonas*-Test: Beeinträchtigungen der Photosynthese durch saline UTD-relevante Abfalleluat auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



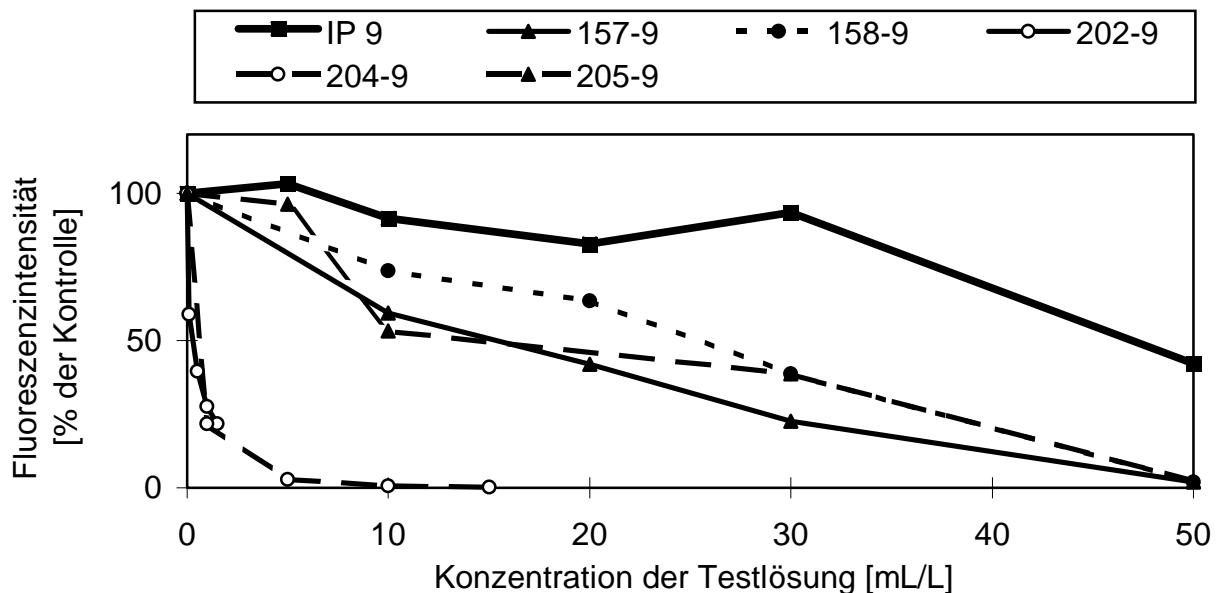
**Abbildung A4: Hemmung der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluat auf Basis von Grundwasser (GW).**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode.



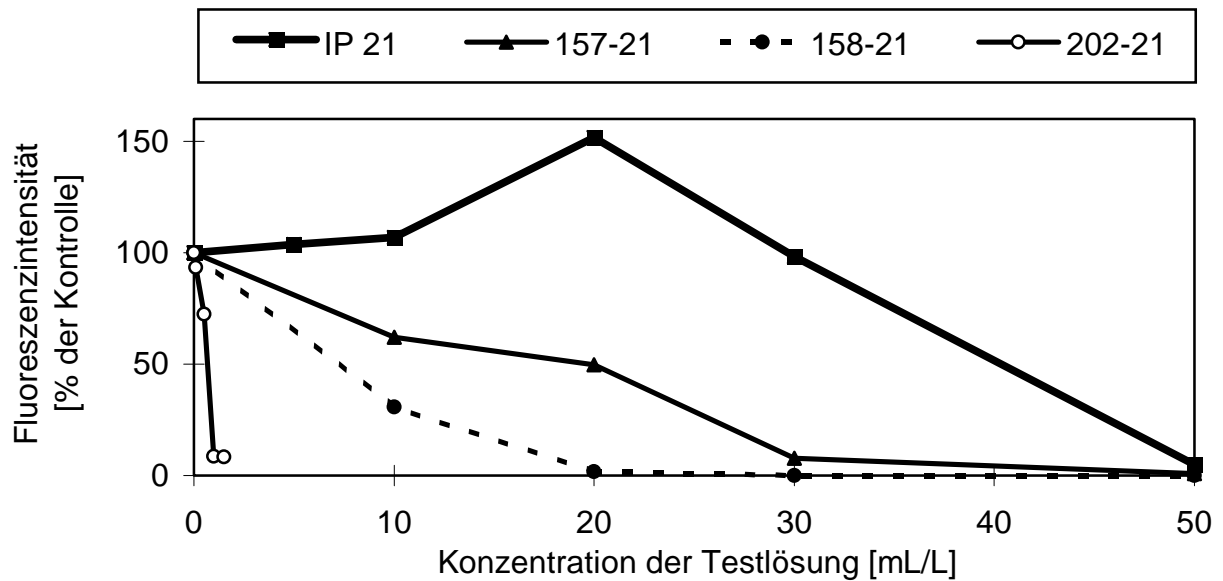
**Abbildung A5: Der FDA Test: Hemmung der FDA-Spaltung durch saline UTD-relevante Abfalleluat auf Basis der Salzlauge IP9.**

Die Durchführung des Tests erfolgte auf Basis der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



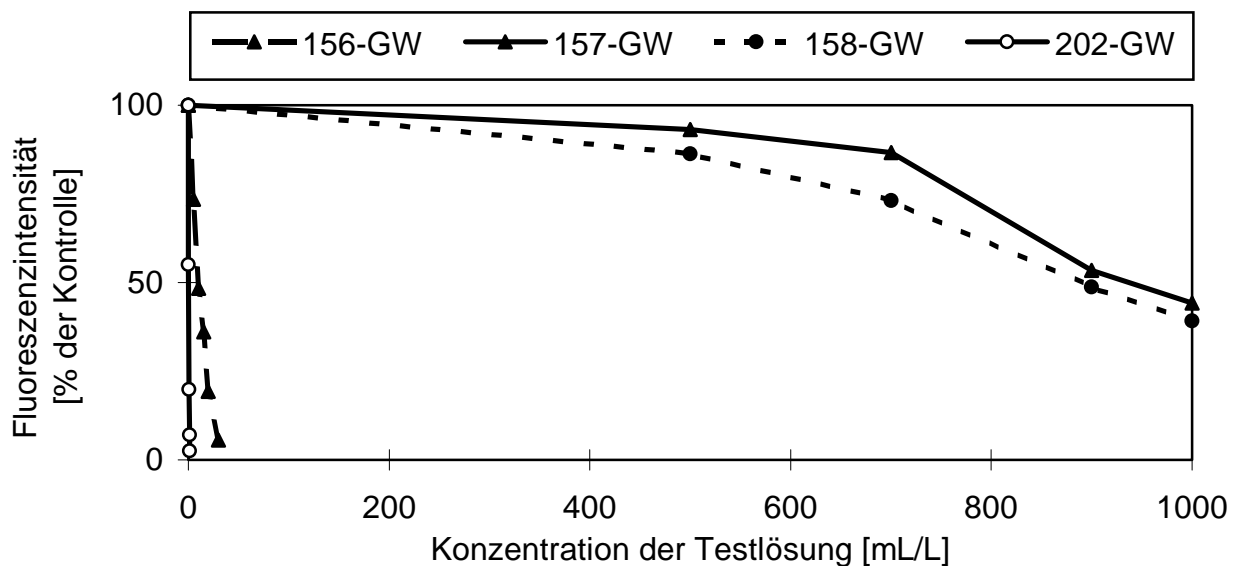
**Abbildung A6: Wirkung von salinen UTD-relevanten Abfalleluaten basierend auf der Salzlauge IP9 auf die FDA-Spaltung.**

Die Durchführung des Tests erfolgte auf Basis der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



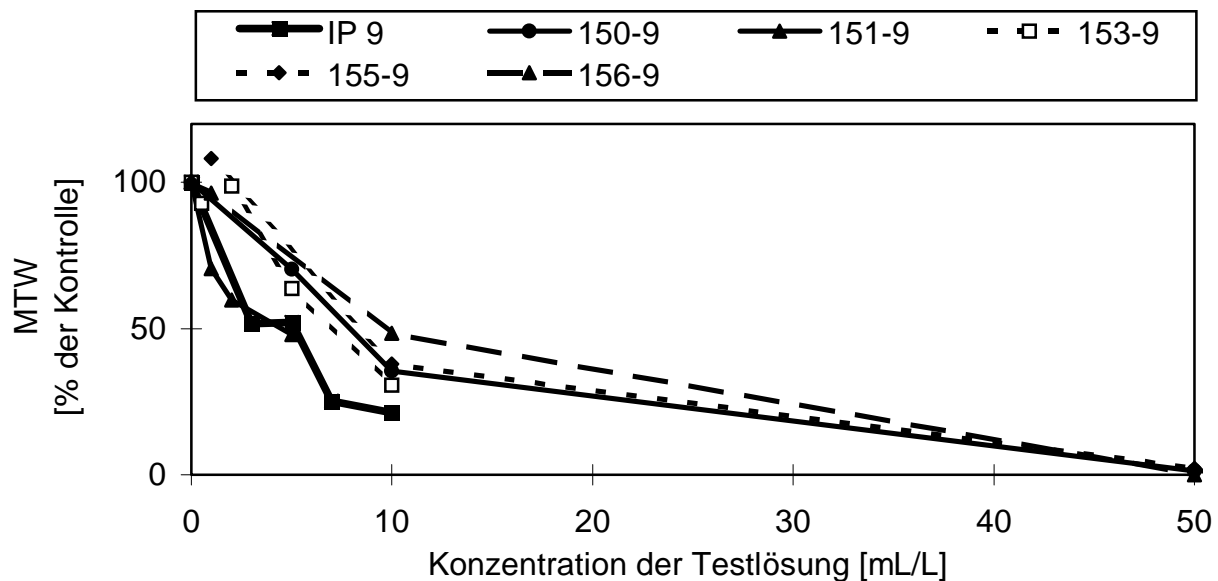
**Abbildung A7: Hemmung der FDA-Spaltung durch saline UTD-relevante Abfall-eluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte auf Basis der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



**Abbildung A8: Hemmung der FDA-Spaltung von *Chlamydomonas reinhardtii* durch verschiedene Grundwassereluate.**

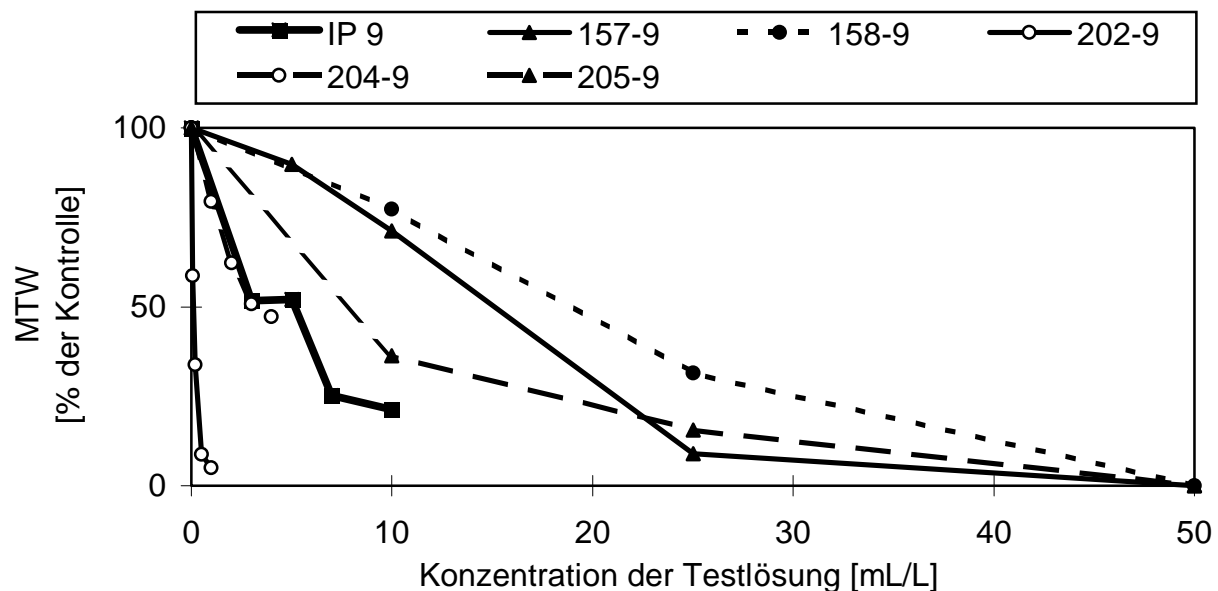
Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode.



**Abbildung A9: Der *Lemna*-Test: Beeinträchtigungen des Blattwachstums durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP9.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

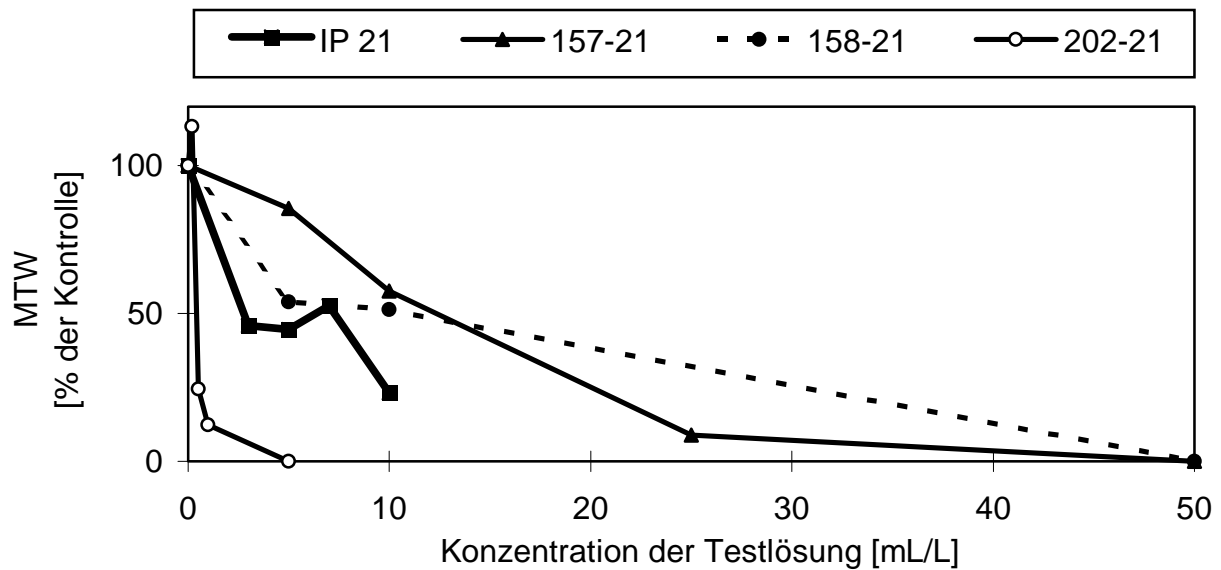
MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient



**Abbildung A10: Hemmung des *Lemna*-Blattwachstums durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP9.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

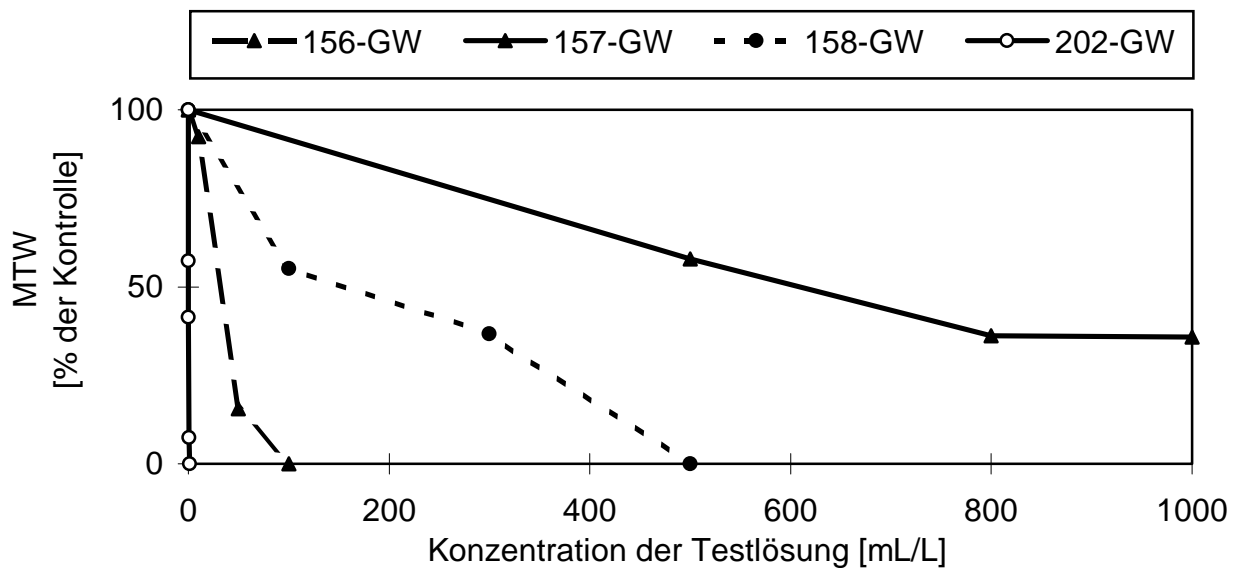
MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient



**Abbildung A11: Beeinträchtigungen des *Lemna*-Blattwachstums durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

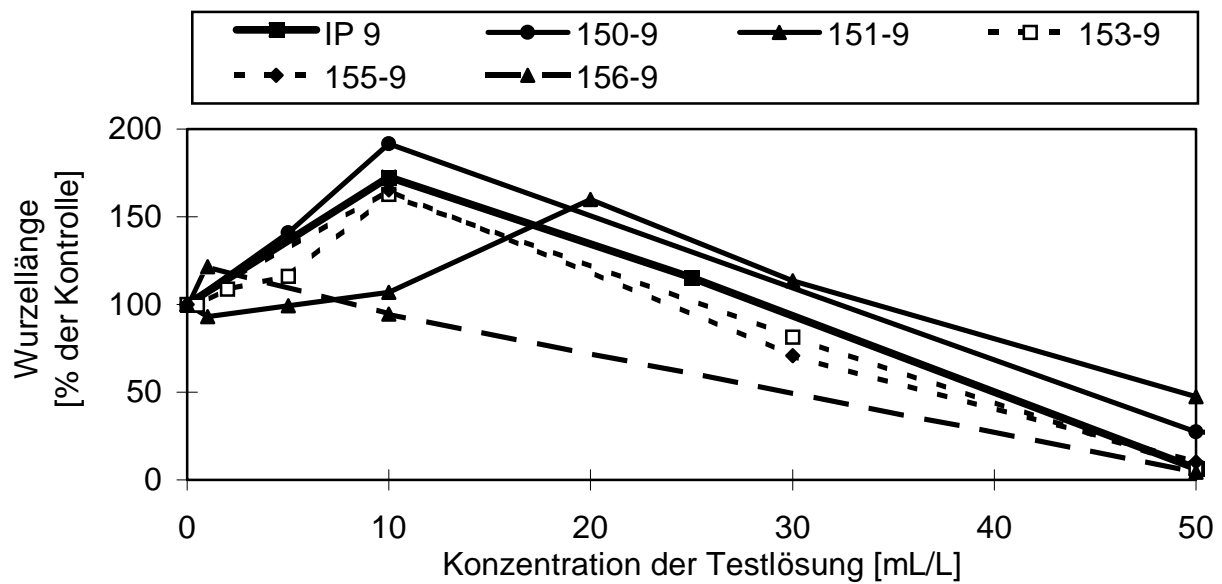
MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient



**Abbildung A12: Beeinträchtigungen des Blattwachstums von *Lemna* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis von Grundwasser.**

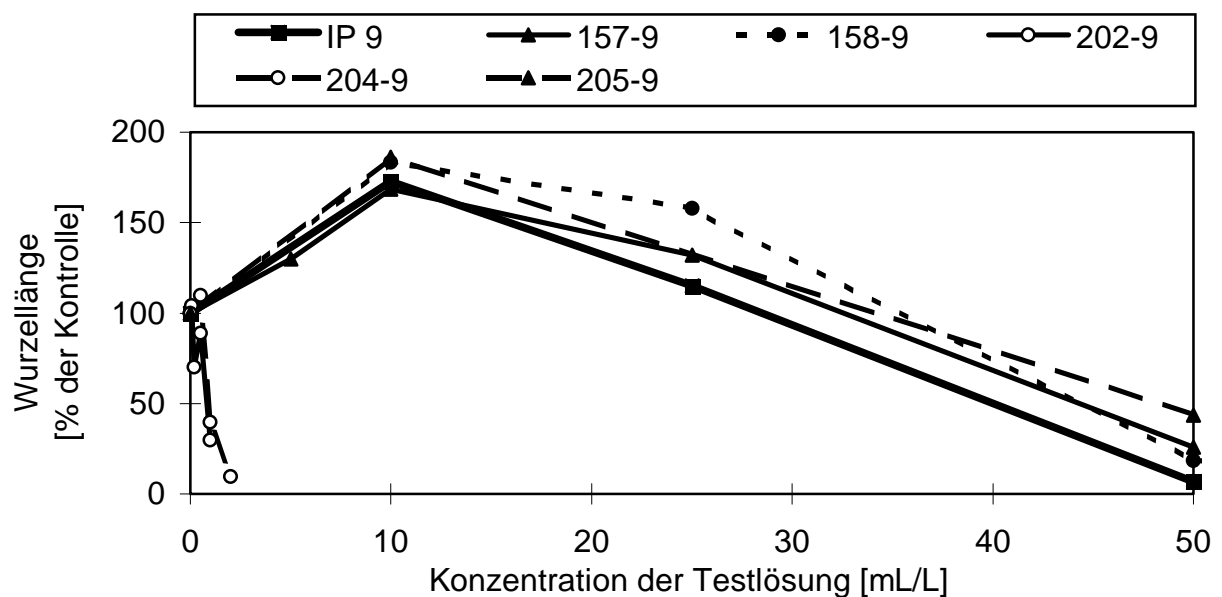
Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode.

MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient



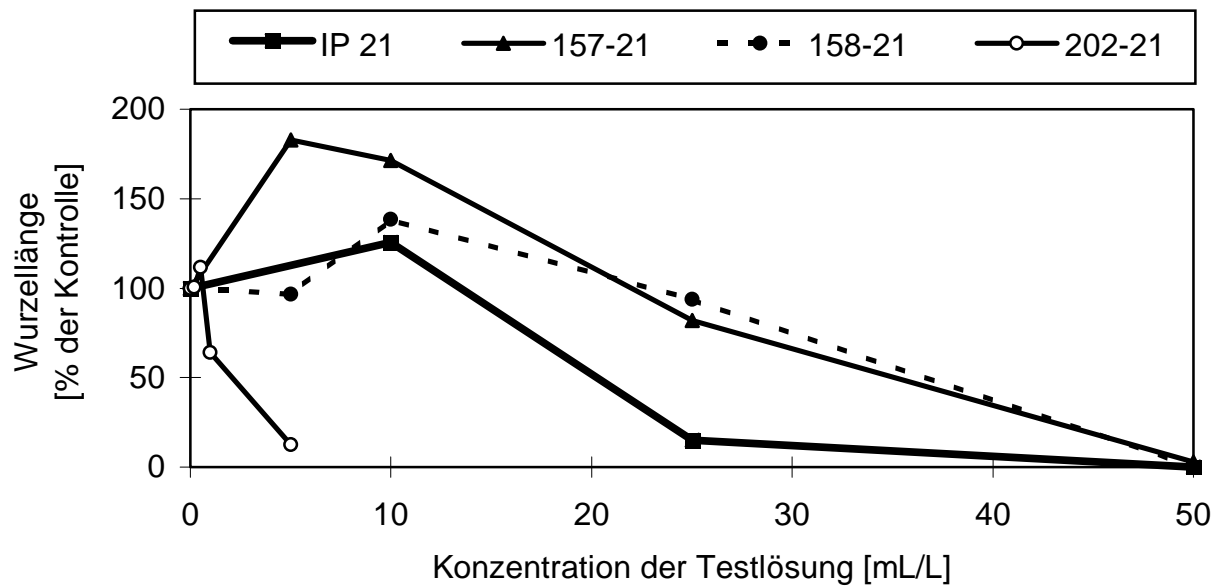
**Abbildung A13: Der *Lepidium*-Test: Beeinträchtigungen der Wurzellänge durch saline UTD-relevante Abfalleluat auf Basis der Salzlauge IP9.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



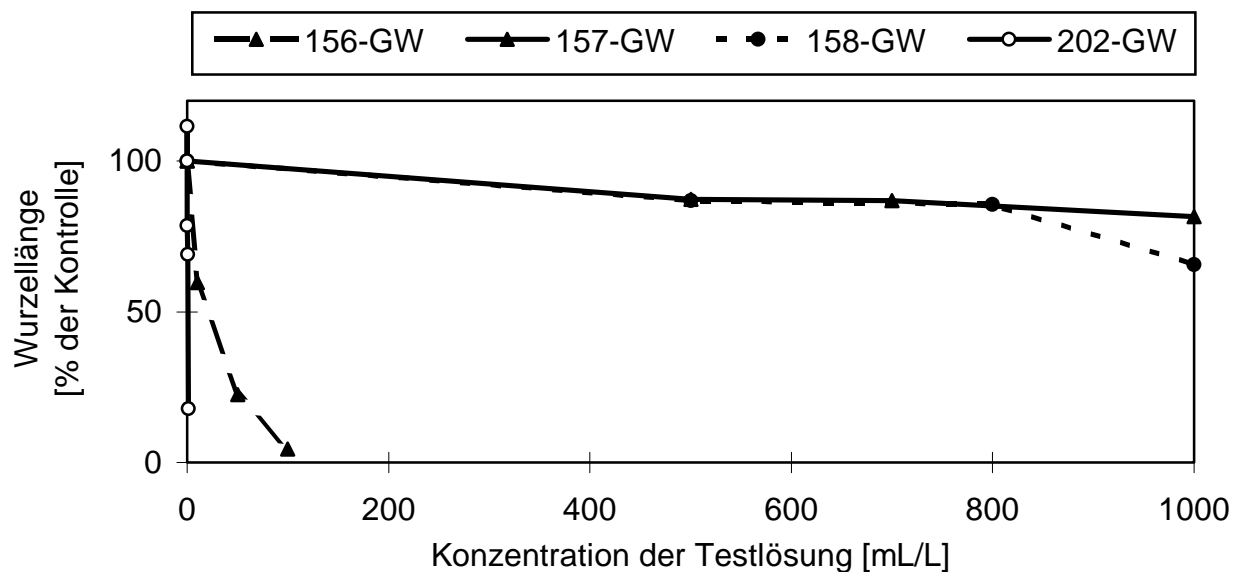
**Abbildung A14: Hemmung der Wurzellänge von *Lepidium* durch saline UTD-relevante Abfalleluat auf Basis der Salzlauge IP9.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP9 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



**Abbildung A15: Hemmung der Wurzellänge von *Lepidium* durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.



**Abbildung A16: Beeinträchtigungen des Wurzellängenwachstums von *Lepidium* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis von Grundwasser.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode.

**Tabelle A1:** Frisch- und Trockengewicht von *Raphanus sativus*, *Lepidium sativum* und *Sorghum bicolor* bei Zugabe einer undotierten und einer mit Schwermetallen dotierten Salzlauge.

Die Tests erfolgten gemäß der Richtlinie der OECD Guidelines For Testing Chemicals Nr. 208 (Kapitel 2.3.4). Als undotierte Salzlauge wurde IP21 eingesetzt, als dotierte eine IP21-Lösung, die synthetisch mit Schwermetallen versetzt wurde (Kapitel 2.2.2.3).

***Raphanus sativus***

	Konzentration der Testlösung [mL/L]	Frischgewicht pro Pflanze [g]	Trockengewicht pro Pflanze [g]
Kontrolle	0	0,31	0,020
undotierte IP21	5	0,44	0,029
undotierte IP21	10	0,52	0,035
undotierte IP21	20	0,34	0,023
dotierte IP21	5	0,39	0,024
dotierte IP21	10	0,41	0,026
dotierte IP21	20	0,33	0,024

***Lepidium sativum***

	Konzentration der Testlösung [mL/L]	Frischgewicht pro Pflanze [g]	Trockengewicht pro Pflanze [g]
Kontrolle	0	0,08	0,007
undotierte IP21	5	0,11	0,009
undotierte IP21	10	0,10	0,011
undotierte IP21	20	0,07	0,007
dotierte IP21	5	0,09	0,007
dotierte IP21	10	0,09	0,009
dotierte IP21	20	0,00	0,000

***Sorghum bicolor***

	Konzentration der Testlösung [mL/L]	Frischgewicht pro Pflanze [g]	Trockengewicht pro Pflanze [g]
Kontrolle	0	0,31	0,017
undotierte IP21	5	0,44	0,015
undotierte IP21	10	0,52	0,012
undotierte IP21	20	0,34	0,021
dotierte IP21	5	0,39	0,015
dotierte IP21	10	0,41	0,008
dotierte IP21	20	0,33	0,004



**Tabelle A2:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach einwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen der undotierten IP21-Lösung. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	703352	613541	512907	532385	552967
2	737981	628150	601368	574587	481257
3	605967	594064	523458	521023	562413
4	444384	443113	423636	400101	499111
5	400371	292974	321379	302713	327060
6	433915	348972	272685	253208	306771
7	418766	337610	325436	312452	292974
8	390632	378683	245904	298655	261323
9	222909	327871	136343	64114	236976
10	160148	0	144458	0	84403
11					0
12					0

**Tabelle A3:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach einwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen der dotierten IP21-Lösung. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	703352	607860	566471	436621	357088
2	737981	617599	596499	443925	508038
3	605967	512908	599745	458533	514531
4	444384	380623	351407	419578	426070
5	400371	336799	353842	335567	234542
6	433915	310829	278366	285745	322190
7	418766	331930	344103	270251	288105
8	390632	307582	262946	284047	105503
9	222909	211818	267004	238600	16231
10	160148	138777	41119	77099	
11		0	0	54104	
12		0			

**Tabelle A4:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach einwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen des mit Schwermetallen dotiertes aqua dest. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	703352	603803	572963	510473	457721
2	737981	546182	552674	476387	472870
3	605967	504792	515342	478822	429587
4	444384	430128	385492	355465	364662
5	400371	404151	396043	296221	293244
6	433915	429317	277554	321379	260782
7	418766	331929	327060	275931	286752
8	390632	344914	302713	150139	320297
9	222909	258077	212088	94141	58432
10	160148	0	42202	0	81156
11			0		0

**Tabelle A5:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach vierwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen der undotierten IP21-Lösung. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	400371	626256	550435	551863	546993
2	391714	598937	470706	557543	599745
3	436080	531156	305959	499923	568906
4	335446	518919	434997	440117	516154
5	325707	473541	488561	337610	585137
6	338692	362769	444736	305148	497488
7	365744	359713	394419	314075	395231
8	351677	311628	335176	366015	290540
9	320297	327973	310829	254019	340045
10	244551	345515	168805	235353	349784
11	239140	231612	170428	195587	375753
12	186118	186660	0	159878	402535
13	0	61679	98470	26782	76287
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0
16		0		0	0
17					0
18					0

**Tabelle A6:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach vierwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen der dotierten IP21-Lösung. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	400371	447983	548616	331118	508038
2	391714	425320	439056	225614	250773
3	436080	370073	361957	275932	336798
4	335446	447171	443925	257266	273489
5	325707	447982	421201	200456	272685
6	338692	460968	405781	213441	393608
7	365744	370884	446900	281342	410651
8	351677	285670	375073	377704	414708
9	320297	344914	275120	394420	326248
10	244551	369261	306771	404158	327871
11	239140	281612	111184	301090	215064
12	186118	80345	103880	317321	0
13	0	0	0	181921	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	
16		0	0	0	
17		0		0	

**Tabelle A7:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach vierwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen des mit Schwermetallen dotiertes aqua dest. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	400371	605267	521023	357899	335175
2	391714	593252	390367	296221	341668
3	436080	519400	364392	316510	198021
4	335446	486938	443113	251585	302705
5	325707	413085	482880	268627	135531
6	338692	360334	468271	340045	236976
7	365744	379000	398416	375754	365203
8	351677	340045	404970	368450	351407
9	320297	351407	387927	341668	361957
10	244551	263758	365203	247527	370073
11	239140	237788	317321	190717	144458
12	186118	148516	262946	104962	0
13	0	0	117947	115783	0
14	0	0	154197	0	0
15	0	0	0	0	0
16			0		

**Tabelle A8:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach achtwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen der undotierten IP21-Lösung. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	522646	524270	546993	435361	510473
2	520482	514877	584081	426511	497488
3	466068	444606	560358	295539	447983
4	380893	403347	514530	345684	464247
5	358376	483691	443618	413086	391985
6	315591	366392	455103	419578	417143
7	380287	441118	482823	399289	430128
8	365744	385042	366015	426009	383057
9	335446	352218	379282	422799	435809
10	345184	350363	394420	321379	403347
11	220851	334163	384778	374429	408216
12	359251	382030	419578	315484	348972
13	222909	361210	382246	340856	343291
14	255372	368450	399227	309395	364392
15	257268	384681	266104	229672	344103
16	178544	305960	193964	222368	113632
17	150658	53022	111996	87649	110449
18	82238	0	75475	62210	0
19	53022	0	83591	0	0
20	0	0	106044	0	0
21	0	0	0	0	
22	0	0	0		
23	0				

**Tabelle A9:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach achtwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen der dotierten IP21-Lösung. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	522646	284859	243329	231734	385492
2	520482	198740	229643	173121	243876
3	466068	121728	208542	224172	275120
4	380893	158255	349568	213050	265719
5	358376	134051	258077	113803	310017
6	315591	154696	344960	140993	337610
7	380287	156695	440690	115162	221557
8	365744	200543	288180	236187	206948
9	335446	218311	313263	209246	136343
10	345184	239411	250773	217002	51940
11	220851	232919	269439	223617	252946
12	359251	167994	318133	215876	222368
13	222909	249150	206678	220745	236802
14	255372	254019	166370	313764	168491
15	257268	205326	120923	220791	122563
16	178544	88627	133097	220745	0
17	150658	67360	84403	220745	0
18	82238	52752	77910	30840	0
19	53022	34897	0	0	0
20	0	0	0	0	
21	0	0			
22	0	0			
23	0				

**Tabelle A10:**  $A_{\max}$ -Werte der Blätter nach achtwöchiger Inkubation in reiner Nährlösung (Kontrolle) und in verschiedenen Konzentrationen des mit Schwermetallen dotiertes aqua dest. Abgefallene Blätter oder Blätter ohne Chlorophyll werden mit 0 erfaßt.

Blattinsertionsnummer	Konzentration der Testlösung [mL/L]				
	0	0,5	1	2,5	5
1	522646	532361	419578	417143	301902
2	520482	314886	289705	254019	161501
3	466068	348475	305959	232919	296220
4	380893	440679	267004	223180	229672
5	358376	375521	151762	259700	78722
6	315591	381435	284859	185036	246715
7	380287	345212	312452	141524	136343
8	365744	361147	243469	161501	59244
9	335446	353841	239411	189906	147705
10	345184	366938	256454	189094	288105
11	220851	346537	272685	241645	309205
12	359251	318911	315698	276743	257240
13	222909	312403	257389	186659	203702
14	255372	278366	305147	167182	107938
15	257268	227984	202891	19478	0
16	178544	170911	235429	46259	0
17	150658	116865	159066	75746	
18	82238	0	80234	0	
19	53022	0	0	0	
20	0	0	0	0	
21	0	0	0		
22	0				
23	0				

**Tabelle A11:** Konzentrationen von ausgewählten Elementen und Anionen in den Grundwassereluataten [mg/L]<sup>1)</sup>. Die Eluate 155-GW und 156-GW enthalten darüber hinaus organische Schwefel- und Stickstoffverbindungen.

	204-GW <sup>2)</sup>	202-GW	158-GW	157-GW	156-GW	155-GW	153-GW	151-GW	150-GW
Cd	< 2,5	12.200	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Co	< 2,5	3,92	< 2,5	< 2,5	7,97	1,26	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Cr	36,3	< 2,5	0,69	0,79	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Cu	< 2,5	460	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Mn	412	14,0	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Ni	33,5	50,4	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Pb	17,8	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	205	< 2,5	262
Sr	< 2,5	4,67	11,10	114	3,02	< 2,5	44,6	31,9	15,3
Zn	59,3	4.500	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	19,0	12,4	6,27
Bromid	< 100	5.900	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 20	525	169	123
Chlorid	< 100	13.100	75,4	71,1	80,8	69,5	106.000	35.300	26.300
Fluorid	< 100	< 50	< 2,5	< 2,5	20.300	10.100	< 100	< 20	< 20
Nitrat	< 100	< 50	19,4	< 2,5	< 50	114	196	< 20	< 20

1) Analytik: M. Müller, Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, TU Braunschweig

2) enthält 114 g Fe/L



**Tabelle A12:** Konzentrationen von ausgewählten Elementen und Anionen in den IP9-Eluaten [mg/L]<sup>1)</sup>. Die Eluate 155-IP9, 156-IP9 und 205-IP9 enthalten darüber hinaus organische Schwefel- und Stickstoffverbindungen.

	205-IP9	204-IP9 <sup>2)</sup>	202-IP9	158-IP9	157-IP9	156-IP9	155-IP9	153-IP9	151-IP9	150-IP9
Cd	< 2,5	21,1	16.100	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	3,02
Co	< 2,5	5,25	< 2,5	< 2,5	< 2,5	4,48	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Cr	< 2,5	23,0	< 2,5	1,17	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Cu	3,49	< 2,5	164	0,66	< 2,5	< 2,5	< 2,5	3,59	< 2,5	< 2,5
Mn	3,39	342,0	12,7	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Ni	< 2,5	42,2	62,7	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Pb	48,7	< 2,5	1.610	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	2.040	< 2,5	10,6
Sr	4,06	< 2,5	< 2,5	1,59	25,0	2,17	0,43	58,9	52,3	19,9
Zn	30,6	13,5	9.010	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	57,0	< 2,5	< 2,5
Bromid	< 500	< 500	13.600	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500
Chlorid	172.000	150.000	180.000	193.000	206.000	185.000	188.000	241.000	214.000	215.000
Fluorid	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	3)	21.000	< 500	< 500	< 500
Nitrat	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500	< 500

1) Analytik: M. Müller, Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, TU Braunschweig

2) enthält 112 g Fe/L

3) keine genaue Angabe, liegt in gleicher Größenordnung wie bei 155-IP9 (Müller, mündliche Mitteilung)

**Tabelle A13:** Konzentrationen von ausgewählten Elementen und Anionen in den IP21-Eluaten [mg/L]<sup>1)</sup>. Im Eluat 155-IP21 sind außerdem organische Schwefel- und Stickstoffverbindungen enthalten.

	204-IP21 <sup>2)</sup>	202-IP21	158-IP21	157-IP21	155-IP21	153-IP21	151-IP21	150-IP21
Cd	28	1.050	< 2,5	< 2,5	< 2,5	19,3	< 2,5	2,56
Co	< 2,5	3,04	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Cu	< 2,5	556	5,3	< 2,5	< 2,5	2,86	< 2,5	< 2,5
Hg	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Mn	330	19,6	< 2,5	1,26	0,38	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Ni	37	37,9	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Pb	16	3.110	1,95	< 2,5	< 2,5	429	< 2,5	14,7
Sr	< 2,5	< 2,5	0,60	35,2	< 2,5	13,4	40	17,9
Zn	13	4.330	< 2,5	< 2,5	< 2,5	73,4	< 2,5	26,6
Bromid	< 500	5.680	159	< 500	< 500	196	147,0	< 500
Chlorid	213.000	232.000	313.000	316.000	304.000	274.000	256.000	272.000
Nitrat	< 500	510	994	10.200	784	< 500	< 500	< 500

1) Analytik: M. Müller, Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, TU Braunschweig

2) enthält 112 g Fe/L

## Abbildungsverzeichnis

### Abbildung 1: Fluoreszenzinduktionskurve (Kautsky-Kurve).

Fo: Grundfluoreszenz, Fm: maximale Fluoreszenz, Fv: Fm-Fo, Ft: terminale Fluoreszenz, die markierte Fläche kennzeichnet  $A_{\max}$ , die Punkte I, D, P, S, M) werden im Text erläutert. ML: Meßlicht, SP: sättigender Puls, AL: aktinisches Licht

### Abbildung 2: Zerfall von FDA bei einer Inkubation in $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /Citrat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten.

50  $\mu\text{L}$  einer FDA-Lösung in Aceton (0,2 % w/v) wurden jeweils zu 1,5 mL eines  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /Citrat-Puffers (0,2/0,1 M) gegeben und 1,5 Stunden inkubiert ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

### Abbildung 3: Variation der Fluoreszenzintensität mit steigender Algenkonzentration.

32 mL einer Algensuspension ( $2 \times 10^7$  Zellen/mL) wurden mit 4 mL FDA-Lösung in Aceton (0,2 % w/v) versetzt. Nach 2 h Inkubation und Trennung der Algen vom Medium wurden unterschiedliche Konzentration der Algensuspension mit PIPES-Puffer (pH 6,1) hergestellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität dieser Algensuspensionen bestimmt ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

### Abbildung 4: Fluoreszenzintensität nach zweistündiger Inkubation von *Chlamydomonas* mit unterschiedlich hohen FDA-Zusätzen.

Je 1 mL der Algensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurde mit verschiedenen Volumina einer FDA-Lösung (0,2 % w/v) inkubiert. Das Endvolumen wurde auf ein einheitliches Volumen von 1,04 mL mit PIPES-Puffer (pH 6,1) eingestellt. Nach zwei Stunden wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

### Abbildung 5: Fluoreszenzintensität der Algensuspension in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit FDA.

Je 1 mL einer Algensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurde 20  $\mu\text{L}$  FDA-Lösung (0,2 % w/v) inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer bestimmt ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

### Abbildung 6: Einfluß der Inkubationsdauer von *Chlamydomonas* mit 150-IP21 (30 mL/L) auf die Hydrolyse von FDA.

Die Algensuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurde unterschiedlich lange mit der Testlösung 150-IP21 (30 mL/L) inkubiert. Jeweils 90 Minuten vor der Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex/Em}}$  490/520 nm) wurden die Ansätze mit 20  $\mu\text{L}$  FDA-Lösung (0,2 % w/v) versetzt. (Für den Ansatz mit einer Inkubationsdauer von 2 Stunden bedeutet dies z.B.: Die Zugabe der FDA-Lösung erfolgte 30 Minuten nach Zusatz der Testlösung 150-IP21.) Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je drei voneinander unabhängigen Versuchen an. RE: Relative Einheiten

### Abbildung 7: Wachstum der *Nicotiana*-Zellkultur.

Die Wachstumskurve wurde durch Subkultivierung von 0,75 g Zellmasse (Frischgewicht) auf 70 mL MS-Medium (Kapitel 2.1.5) auf einem Rotationsschüttler (120 U/min) bei 26 °C im Dunkeln erstellt. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

**Abbildung 8: Der *Chlamydomonas*-Test: Beeinträchtigungen der Photosynthese durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

**Abbildung 9: Hemmung der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* durch zwei verschiedene Salzlaugen und auf diesen basierende Abfalleluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

**Abbildung 10: Hemmung der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis von Grundwasser.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode.

**Abbildung 11: Wirkung verschiedener Grundwassereluate auf die Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

**Abbildung 12: Der FDA Test: Hemmung der FDA-Spaltung durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte auf Basis der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode. Dargestellt ist eine Auswahl der getesteten Eluate. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

**Abbildung 13: Wirkung zwei verschiedenen Salzlaugen und auf diesen basierende Abfalleluate auf die FDA-Spaltung von *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

**Abbildung 14: Hemmung der FDA-Spaltung von *Chlamydomonas reinhardtii* durch verschiedene Grundwassereluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode.

**Abbildung 15: Wirkung verschiedener Grundwassereluate auf die FDA-Spaltung von *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Der Test wurde gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Standardmethode durchgeführt. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

**Abbildung 16: Der *Lemna*-Test: Beeinträchtigungen des Blattwachstums durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.** Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient

**Abbildung 17: Hemmung des Blattwachstums von *Lemna minor* durch zwei verschiedene Salzlagen und auf diesen basierende Abfalleluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

**Abbildung 18: Beeinträchtigungen des Blattwachstums von *Lemna* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis von Grundwasser.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. MTW: Mittlerer täglicher Wachstumskoeffizient

**Abbildung 19: Hemmung des Blattwachstums von *Lemna minor* durch verschiedene Grundwassereluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.1 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

**Abbildung 20: Der *Lepidium*-Test: Beeinträchtigungen der Wurzellänge durch saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis der Salzlauge IP21.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. IP21 beschreibt die schwermetallfreie Salzlösung, auf deren Grundlage die Eluate der UTD-relevanten Abfallstoffe hergestellt wurden.

**Abbildung 21: Hemmung des Wurzellängenwachstums von *Lepidium sativum* durch zwei verschiedene Salzlagen und auf diesen basierende Abfalleluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

\*: Für dieses Eluat wurde aufgrund seiner Wachstumsstimulation (abnormes Streßwachstum) kein EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt.

X: Von diesen Abfällen wurden keine IP21-Eluate hergestellt.

**Abbildung 22: Beeinträchtigungen des Wurzellängenwachstums von *Lepidium sativum* durch nicht-saline UTD-relevante Abfalleluate auf Basis von Grundwasser.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode.

**Abbildung 23: Hemmung des Wurzellängenwachstums von *Lepidium sativum* durch verschiedene Grundwassereluate.**

Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß der in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardmethode. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates. In der Grafik sind zusätzlich die Zahlenwerte der EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L angegeben.

\*: Für diese Eluate konnte aufgrund ihrer geringen Toxizität kein EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden.

**Abbildung 24: Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte aller mit dem *Lepidium*-Wurzellängentest, dem *Lemna*-Blattwachstumstest, dem *Chlamydomonas*-Photosynthesetest und dem *Chlamydomonas*-FDA-Test untersuchten Grundwassereluate.**

Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß den in Kapitel 2.3 beschriebenen Standardmethoden. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates.

Von den Eluaten 157-GW und 158-GW konnte aufgrund ihrer geringen Toxizität mit dem *Lepidium*-Wurzellängentest kein EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden.

**Abbildung 25: Hemmung der Eluate 202-IP9 und 202-IP21 auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium*, das Blattwachstum von *Lemna*, die Photosyntheserate und die FDA-Spaltung von *Chlamydomonas*.**

Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß den in Kapitel 2.3 beschriebenen Standardmethoden. Die Ergebnisse sind als EC<sub>50</sub>-Werte in mL/L dargestellt. Je kleiner der EC<sub>50</sub>-Wert, desto größer die Toxizität des Eluates.

**Abbildung 26 a bis d: Hemmung des Blattwachstums von *Lemna* und des Wurzellängenwachstums von *Lepidium* durch die beiden Salzlösungen IP9 und IP21 unter Verwendung zweier verschiedener Nährlösungen.**

Die Wirkungen der beiden Salzlösungen wurden nach der in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Methode getestet. Als Nährlösung wurde jedoch parallel zu der dort genannten Welch-Lösung die Lösung nach Devare und Bahadir (Kapitel 2.1.2) verwendet.

**Abbildung 27: Einfluß verschiedener Nährlösungen sowie von Leitungs- und destilliertem Wasser auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium*.**

Der Test basierend auf der Welch-Lösung ist gemäß dem in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Standardverfahren ohne Verwendung einer toxischen Testlösung durchgeführt worden. Darüber hinaus sind an Stelle der Welch-Lösung die Nährlösung nach Devare/Bahadir (Kapitel 2.1.2) sowie Leitungswasser und aqua dest. ohne weitere Zusätze eingesetzt worden. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je 50 voneinander unabhängigen Messungen an.

**Abbildung 28: Einfluß von Rückständen aus gefriergetrocknetem Leitungs- und destilliertem Wasser auf das Wurzellängenwachstum von *Lepidium sativum*.**

*Lepidium*-Samen wurde in Welch-Nährlösung bzw. aqua dest. ohne Zusätze und unter Zugabe unterschiedlicher Mengen gefriergetrockneten Leitungswasserrückständen (Kapitel 2.2.2.5) kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Wurzellängen der *Lepidium*-Keimlinge bestimmt.

NL: Nährlösung; LW: Leitungswasser; a. dest.: destilliertes Wasser.

Erläuterung der Angaben in % (z.B. NL 25 % LW): 25 mL Leitungswasser wurden gefriergetrocknet und der Rückstand anschließend mit 100 mL Nährlösung aufgefüllt.

Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je 20 voneinander unabhängigen Versuchen an.

**Abbildung 29: Frisch- und Trockengewicht von *Raphanus sativus* bei Zugabe einer undotierten und einer mit Schwermetallen dotierten Salzlauge.**

Dieser Test erfolgte gemäß der Richtlinie der OECD Guidelines For Testing Chemicals Nr. 208 (Kapitel 2.3.4). Als undotierte Salzlauge wurde IP21 eingesetzt, als dotierte eine IP21-Lösung, die synthetisch mit Schwermetallen versetzt wurde (Kapitel 2.2.2.3). Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je neun voneinander unabhängigen Versuchen an.

**Abbildung 30: Einfluß der undotierten und einer mit Schwermetall dotierten IP21-Salzlauge auf das Wachstum einer *Nicotiana*-Zellkultur.**

Der Versuch wurde gemäß der in Kapitel 2.3.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

**Abbildung 31: Einfluß der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Salzlauge auf den Quotienten  $F_v/F_m$  von *Nicotiana*.**

Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode durchgeführt. Angegeben sind die  $F_v/F_m$ -Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

**Abbildung 32: Wirkung der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Salzlauge auf den Vitalitätsindex-Faktor Rfd von *Nicotiana*.**

Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode durchgeführt. Angegeben sind die Rfd-Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

**Abbildung 33: Veränderung des Parameter  $A_{\max}$  bei Kultivierung von *Nicotiana* in einer undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Salzlauge.**

Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode durchgeführt. Angegeben sind die  $A_{\max}$ -Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

**Abbildung 34: Wirkung der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung auf den Parameter "Yield" der Chlorophyllfluoreszenz von *Nicotiana* ohne zusätzlichen Lichtstreß.**

Der Versuch wurde nach der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Methode unter Verwendung der Stufe 6 des aktinischen Lichtes durchgeführt. Es sind die "Yield"-Werte des jeweils fünften Blattes von oben nach vierwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Testlösungen angegeben. Die Schwermetallgehalte der dotierten IP21-Lösung sind in Kapitel 2.2.2.3 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von je vier voneinander unabhängigen Versuchen an.

RE: relative Einheiten

**Abbildung 35: Einfluß der undotierten und der mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung auf den Parameter "Yield" der Chlorophyllfluoreszenz von *Nicotiana* mit zusätzlichem Lichtstreß.**

Der Versuch unterscheidet sich von dem in Abbildung 34 dargestelltem darin, daß "Yield" unter zusätzlichem Lichtstreß (aktinisches Licht Stufe 10 statt 6) aufgenommen wurde. Zur sonstigen Durchführung und Fehlerlinien: Abbildung 34.

RE: relative Einheiten

**Abbildung 36: Bleikonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**

Die Pflanzen wurden vier Wochen lang in einer Nährlösung (Kapitel 2.1.2) oder in mit Schwermetall dotierter IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3) kultiviert (Kapitel 2.3.6). Die Analyse der Bleikonzentration erfolgte gemäß der in Kapitel 2.5 beschriebenen Methode.

TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

**Abbildung 37: Kupferkonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**

Die Analyse der Kupferkonzentration wurde nach der in Kapitel 2.5 beschriebenen Methode durchgeführt, nachdem die Pflanzen vier Wochen lang in einer Nährlösung (Kapitel 2.1.2) oder in mit Schwermetall dotierter IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3) kultiviert (Kapitel 2.3.6) worden sind. TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

**Abbildung 38: Nickelkonzentration der unterschiedlichen Gewebe von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 37. TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

**Abbildung 39: Cd-Konzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 37. TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

**Abbildung 40: Zinkkonzentration der unterschiedlichen Gewebe von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 37. TS: Trockensubstanz. Bestimmungsgrenze: <5 mg/kg TS

**Abbildung 41: Magnesiumkonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Nach einer vierwöchigen Kultivierung mit einer Welch-Nährlösung als Kontrolle und sowohl einer undotierten (Kapitel 2.2.2.1) als auch einer mit Schwermetallen dotierten IP21-Lösung (Kapitel 2.2.2.3) erfolgte eine Analyse der Magnesiumkonzentration wie in Kapitel 2.5 beschrieben.

**Abbildung 42: Natriumkonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

**Abbildung 43: Schwefelkonzentration in unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

**Abbildung 44: Kaliumkonzentration in den Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

**Abbildung 45: Calciumkonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

**Abbildung 46: Borkonzentration in den unterschiedlichen Geweben von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41.

**Abbildung 47: Mangankonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41. Bestimmungsgrenze: < 5 mg/kg TS.



**Abbildung 48: Molybdänkonzentration in verschiedenen Geweben von *Nicotiana tabacum*.**

Beschreibung der Kultivierung mit den Testlösungen und der Analysenmethode: Abbildung 41. Bestimmungsgrenze: < 5 mg/kg TS.

**Abbildung 49: Schematische Darstellung einer Tabakpflanze.**

Die Zahlen geben die Blatinserptionsnummern an.

**Abbildung 50: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach einwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Die Kultivierung der Pflanzen und die Messung der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte nach den in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Verfahren. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

**Abbildung 51: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach vierwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

**Abbildung 52: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach achtwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

**Abbildung 53: Fv/Fm-Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

**Abbildung 54:  $A_{\max}$ -Werte der Blätter von *Nicotiana tabacum* nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in undotierter und dotierter IP21-Lösung sowie in dotiertem aqua dest.**

Kultivierung der Pflanzen und Durchführung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz Abbildung 50. Zusammensetzung der Testlösungen: Abbildung 50.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen

**Abbildung 55: Schematische Darstellung einer Tabakpflanze in der nullten, der vierten und der achten Woche der Kultivierung mit den Testlösungen.**

Das "erste Blatt" zum Zeitpunkt der Zugabe der Testlösungen wurde schwarz markiert. Die Blätter wurden mit ihrer jeweiligen Blatinserptionsnummer gekennzeichnet.

**Abbildung 56: Einfluß verschiedener Testlösungen auf die Geschwindigkeit der Blattneubildung an der Sproßspitze von *Nicotiana*.**

Die jeweilige Blattinsertionsnummer eines markierten Blattes wurde über einen Zeitraum von 14 Wochen, bedingt durch die Entwicklung neuer Blätter an der Sproßspitze, erhöht.

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte nach dem in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Verfahren. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen.

**Abbildung 57: Wirkung von drei verschiedenen Testlösungen auf den Fv/Fm-Wert desjenigen Blattes mit der Blattinsertionsnummer 1 zu Versuchsbeginn (das "erste Blatt").**

Die Kultivierung der Pflanzen und die Messung der Fv/Fm-Werte erfolgte gemäß den in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Verfahren. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen.

**Abbildung 58: Vergleich der Wirkungen der drei Testlösungen auf den Fv/Fm-Wert von *Nicotiana* nach vierzehnwöchiger Kultivierung mit den Lösungen in zwei verschiedenen Konzentrationen.**

Messung der Fv/Fm-Werte und Kultivierung der Pflanzen: Kapitel 2.3.6.

Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4.

Die Zahlen in der Abbildung geben die Mittelwerte der Fv/Fm-Werte der obersten 15 Blätter der jeweiligen Pflanzen an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bzw. vier Messungen. Abgefallene Blätter oder solche ohne Chlorophyll wurden mit dem Wert 0 in die Grafiken eingetragen.

**Abbildung 59: Chlorophyllgehalt (a+b) der Blätter von *Nicotiana* nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in verschiedenen Testlösungen (0,5 mL/L) bzw. in reiner Nährlösung (Kontrolle).**

Die Kultivierung der Pflanzen wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Chlorophyllbestimmung: Kapitel 2.4.

**Abbildung 60: Chlorophyllgehalt (a+b) der Blätter von *Nicotiana* nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in verschiedenen Testlösungen (5 mL/L) bzw. in reiner Nährlösung (Kontrolle).**

Die Kultivierung der Pflanzen wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Chlorophyllbestimmung: Kapitel 2.4.

**Abbildung 61: Frischgewicht von *Nicotiana*, getrennt nach Blättern, Wurzeln und Sproß, nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen in drei unterschiedlichen Testlösungen bzw. reiner Nährlösung (Konzentration der Testlösung: 0 mL/L).**

Die Kultivierung der Pflanzen wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung der undotierten und der dotierten IP21-Salzlösung bzw. des dotierten aqua dest.: Kapitel 2.2.2.1, Tabelle 3 und Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 5. bzw. Kapitel 2.2.2.4. Die Frischgewichtbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.4 angegeben. Die Fehlerlinien an den einzelnen Meßpunkten geben die Standardabweichung von voneinander unabhängigen Messungen an drei bzw. vier Pflanzen an.

**Abbildung 62: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments von *Nicotiana* (Kontrollpflanze).**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

**Abbildung 63: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 0,5 mL/L undotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.1, Tabelle 3. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

**Abbildung 64: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 1 mL/L undotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.1, Tabelle 3. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

**Abbildung 65: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 5 mL/L undotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.1, Tabelle 3. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

**Abbildung 66: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 0,5 mL/L dotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

**Abbildung 67: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 2,5 mL/L dotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder, Int: Interzellularraum

**Abbildung 68: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines quer gebrochenen Wurzelsegments einer *Nicotiana*-Pflanze, nach vierzehnwöchiger Kultivierung in 5 mL/L dotierter IP21-Lösung.**

Die Wurzel wurde 7 mm hinter ihrer Spitze unter Vakuum quer gebrochen. Methode: Kapitel 2.6. Kultivierung der Pflanze und Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Die in den Zellen erkennbaren Strukturen sind keine authentischen Zellinhalte, sondern entstanden durch das Gefrieren der Zellen.

Rhi: Rhizodermis, Hyp: Hypodermis, Rin: Rinde, End: Endodermis, Zen: Zentralzylinder.

**Abbildung 69: Kalium- und Chlorkonzentration in den Vakuolen der Wurzeln von *Nicotiana tabacum*, nachdem diese 14 Wochen mit unterschiedlichen Konzentrationen einer schwermetallhaltigen Salzlösung (dotierte IP21) bzw. ohne Zusätze (Kontrolle) kultiviert wurden.**

Kultivierung der Pflanzen und Zusammensetzung der Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Methode der EDX-Analysen: Kapitel 2.6.

**Abbildung 70: Kalium- und Chlorkonzentration der einzelnen Gewebe der Wurzeln von *Nicotiana tabacum*, nach vierzehnwöchiger Kultivierung der Pflanzen mit 2,5 mL/L schwermetallhaltigen Salzlösung (dotierte IP21).**

Kultivierung der Pflanzen und Zusammensetzung der Testlösung: Kapitel 2.3.6 und 2.2.2.3, Tabelle 5. Methode der EDX-Analysen: Kapitel 2.6.

**Abbildung 71: Veränderung des Fv/Fm-Wertes der Blätter von *Nicotiana* durch Kultivierung der Pflanzen in deionisiertem Wasser ohne Nährstoffzufuhr.**

Junge *Nicotiana*-Pflanzen im Fünfblattstadium wurden aus einer Welch-Nährlösung (Kapitel 2.1.2, Tabelle 1) in deionisiertes Wasser gegeben und 9 Wochen ohne Nährstoffzufuhr darin kultiviert. Die Messung der Fv/Fm-Werte erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 angegeben.

## **Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Nährlösungen nach DEVARE und BAHADIR 1994 und nach WELCH et al. 1993.

**Tabelle 2:** Verwendete Abfälle mit Abfall-Schlüsseln und Numerierung gemäß der chemischen Analyse (CA) der GRS.

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Analysen zur Elementzusammensetzung und pH-Werte der verwendeten Elutionsmittel (IP9- und IP21-Salzlauge, Grundwasser aus Freiberg). Aufgrund der starken Störungen durch die hohen Salzgehalte in der IP9- und der IP21-Lösung beträgt die Nachweisgrenze der Analyse hier 5 mg/L, für das Grundwasser mit nur einem geringen Salzgehalt beträgt sie 0,5 mg/L.

**Tabelle 4:** Höchste bei der Elution der verschiedenen Abfälle erzielte Kaskadenstufe

**Tabelle 5:** Eingewogene und gemessene Schwermetallkonzentrationen der dotierten und der undotierten IP21-Lauge im Vergleich